

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
 United States Patent and Trademark
 Office
 Box PCT
 Washington, D.C.20231
 ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 08 February 2000 (08.02.00)	
International application No. PCT/EP99/04892	Applicant's or agent's file reference 1998/FO83 NP
International filing date (day/month/year) 10 July 1999 (10.07.99)	Priority date (day/month/year) 22 July 1998 (22.07.98)
Applicant BOHNET, Karin et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

11 January 2000 (11.01.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer F. Baechler Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TENT COOPERATION TRE: /

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES
GMBH & CO. KG
Patent- und Lizenzabteilung
Industriepark Höchst
Gebäude D 706
D-65926 Frankfurt am Main
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 25 May 2000 (25.05.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 1998/FO83 NP	
International application No. PCT/EP99/04892	
	International filing date (day/month/year) 10 July 1999 (10.07.99)

1. The following indications appeared on record concerning:

☐ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES
GMBH & CO. KG
Patent- und Lizenzabteilung
Industriepark Höchst
Gebäude K 801
D-65926 Frankfurt am Main
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

069-305-4305

Facsimile No.

069-305-16350

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES
GMBH & CO. KG
Patent- und Lizenzabteilung
Industriepark Höchst
Gebäude D 706
D-65926 Frankfurt am Main
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

069-305-4303

Facsimile No.

069-305-16350

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

Please note new address for correspondence.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority ☒ the elected Offices concerned
☒ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

A. Karkachi

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12N 15/61, 15/82, 9/90, C07K 16/40, C12Q 1/68, A61K 31/713, 38/52, G01N 33/573</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/05388</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 3. Februar 2000 (03.02.00)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/04892</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 10. Juli 1999 (10.07.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 32 783.8 22. Juli 1998 (22.07.98) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES GMBH & CO. KG [DE/DE]; D-65926 Frankfurt am Main (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BOHNET, Karin [DE/DE]; Am Wehr 5, D-65835 Liederbach (DE). HÜLS, Christoph [DE/DE]; Rheinblick 19, D-55263 Wackernheim (DE). MÜLLNER, Stefan [DE/DE]; Hagebuttenweg 21, D-40764 Langenfeld (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, IN, JP, KR, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.</p>	

(54) Title: GENES OF THE DEAD BOX PROTEIN FAMILY, THEIR EXPRESSION PRODUCTS AND USE

(54) Bezeichnung: GENE DER DEAD BOX PROTEINFAMILIE, DEREN EXPRESSIONSPRODUKTE UND VERWENDUNG

(57) Abstract

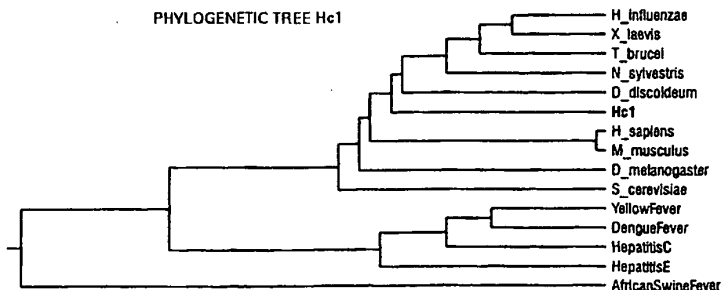
The invention relates to the preparation of two novel nucleic acids -Hc1 and Hc2- which are homologous to known DEAD box proteins, which correspond to RNA helicases, and which can be obtained from ciliates. The invention also relates to the insertion of the novel nucleic acids into suited target cells using recombinant DNA technologies, and to the use thereof for regulating transcription and translation. In addition, the invention relates to the in-vitro or in-vivo transcription of the novel nucleic acids for producing novel proteins and to the use thereof in treatment and diagnosis.

(57) Zusammenfassung

Neue Gene der Dead Box Proteinfamilie, deren Expressionsprodukte und Verwendung. Die vorliegende Erfindung beschreibt die Bereitstellung zweier neuer Nukleinsäuren - Hc1 und Hc2 - die homolog zu bekannten DEAD-Box-Proteinen, korrespondierend mit RNA-Helikasen sind und aus Ciliaten gewonnen werden können. Die Erfindung beschreibt weiterhin das Einbringen der neuen Nukleinsäuren über rekombinante DNA-Technologien in geeignete Zielzellen und deren Verwendung für die Regulation der Transkription und der Translation. Die Erfindung beschreibt weiterhin die Transkription in vitro oder in vivo der neuen Nukleinsäuren zur Herstellung neuer Proteine, sowie deren Verwendung in Therapie, Diagnostik.

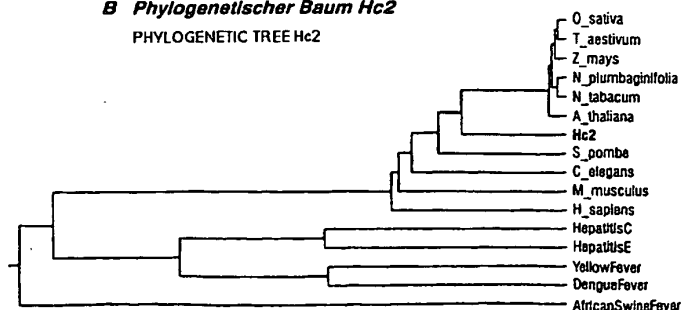
A Phylogenetischer Baum Hc1

PHYLOGENETIC TREE Hc1



B Phylogenetischer Baum Hc2

PHYLOGENETIC TREE Hc2



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

GENE DER DEAD BOX PROTEINFAMILIE, DEREN EXPRESSIONSPRODUKTE UND VERWENDUNG

5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Bereitstellung neuer Nukleinsäuren aus Ciliaten kodierend für Expressionsprodukte, vorzugsweise RNA-Helikasen aus der Familie der DEAD-Box-Proteine sowie deren Verwendung.

10

Die Modulation der RNA-Struktur hat eine essentielle Funktion in zellulären Vorgängen wie z.B. beim prä-mRNA-Spleißen, beim RNA-Transport oder bei der Proteintranslation, da die zelluläre RNA in der Zelle in unterschiedlichen Sekundär- und Tertiärstrukturen vorliegt und daneben eine Vielzahl von RNA-bindender

15 Proteine für eine weitere Strukturierung der RNA sorgt. An diesen Modulationsvorgängen sind u.a. Proteine aus der Familie der sogenannten DEAD-Proteinfamilie beteiligt. Die Mitglieder dieser Proteinsuperfamilie, die als Charakteristikum eine Reihe homologer Proteinsequenzen, sogenannte „Proteinboxen“ enthalten, sind nach dem hochkonservierten Tetrapeptid Asp-Glu-
20 Ala-Asp, im Einbuchstabencode DEAD, als Motiv benannt. Zu dieser Proteinsuperfamilie gehören insbesondere RNA-Helikasen.

Die charakteristischen Proteinsequenzen der DEAD-Proteine sind in der Evolution hochkonserviert (Vgl. Figur 1).

25

Die DEAD-Superfamilie gliedert sich in verschiedene Unterfamilien, die nach ihrem Sequenzmotiv DEAD-, DEAH- oder DExH-Unterfamilie genannt werden. Alle Familienmitglieder besitzen eine ATP-Binde- und RNA-Bindefunktion sowie eine ATP-Hydrolyse- und zumeist eine RNA-Helicasefunktion (Fig. 2).

30 Die verschiedenen Mitglieder der DEAD-Box-Protein-Familie zeichnen sich aus durch eine konservierte Region, die ca. 300 Aminosäuren umfaßt und von nichtkonservierten Aminosäuresequenzen variierender Länge flankiert wird

(Schmid S.R., Lindner P., Mol Cell Biol 1991 11: 3463-3471).

Innerhalb der konservierten Region liegen die sogenannten Homologieboxen (synonym konservierte Motive), wovon eine die „DEAD-Box“ ist. Die

Homologieboxen verleihen den Mitgliedern der DEAD-Box-Familie nicht nur strukturelle sondern auch funktionelle Ähnlichkeit. Unter Berücksichtigung der Homologieboxen (siehe Figur 2) sind DEAD-Box Proteine putative ATP-abhängige RNA-Helikasen, die an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt und mit der Veränderung der Sekundärstruktur von RNA-Molekülen in Zusammenhang stehen (Fuller-Pace F.V. Trends Cell Biol. 1994 4:271-274, Pause A., Sonenberg N., Curr Opin Struct Biol 1993 3:953-959). Helikase-abhängige Prozesse sind ebenfalls beschrieben worden für: Initiation der Translation, nukleares und mitochondriales RNA-Spleißing, mRNA-Transport, Ribosom- und Spleißosom-Assembly, mRNA-Stabilisierung und mRNA Abbau (Iost I., Dreyfus M., Nature 1994 372:193-196).

Die Funktionen der RNA-Helikasen korrespondierend mit den DEAD-Homologieboxen in zellulären Prozessen, vorzugsweise im Rahmen der Proteinbiosynthese, erlauben diese Enzyme gezielt einzusetzen im Hinblick auf pharmazeutische, landwirtschaftliche oder biotechnische und analytische Anwendungen.

Wichtige pharmazeutische Anwendungen sind die Entwicklung von Substanzen, die spezifisch bakterielle, parasitäre, virale oder aus pathogenen Pilzen stammende Helikasen hemmen, jedoch keine Hemmwirkung auf menschliche Helikasen haben.

Da Helikasen zumeist essentielle Enzyme sind, kann man durch spezifische Hemmung dieser Enzyme eine Abtötung des Pathogens (Bakterium, Pilz, Parasit/Protozoen, Virus) erreichen. Nach Missel et al. führt bei bestimmten Protozoen (*Trypanosoma*, *Leishmania*, *Crithidia*) das Ausschalten des Gens für ein DEAD-Box-Protein zu verringertem Wachstum (Missel A., Souza A.E., Norskau G., Goring H.U., Mol Cell Biol 1997 17:4895-903). Im Malariaerreger *Plasmodium falciparum* kontrollieren Helikasen die Protein-Translation, Mitose sowie DNA Reparatur (Thelu J, Burnod J, Bracchi V, Ambroise-Thomas P, DNA Cell

Biol 1994 13: 1109-1115). Helikasen sind essentiell für die Initiation der Translation, im Spleißosom, im Zellzyklus und Ribosomen Zusammenbau in Hefe. So ist z. B. das DEAD-Box-Protein ROK1 essentiell für die Lebensfähigkeit von Hefe, für das prä-rRNA-Processing, und für mitotisches Wachstum. Ausschalten von ROK1 blockiert 18S rRNA Synthese (Venema J., Bousquet-Antonelli C., Gelugne J.P., Caizgues-Ferrer M., Tollervey, Mol Cell Biol 1997 17: 3398-3407).

Ca. 80% aller „positive-stranded“ RNA Viren deren Genome sequenziert sind, kodieren für mindestens eine putative Helikase. Beispiele sind NS3 des Hepatitis C Virus, Helikasen des menschlichen Coronavirus und des Adeno-associated Virus, Vaccinia Virus Helikase (Kadare G., Haenni A.L., J Virol 1997: 2583-2590). Mögliche Rollen für virale Helikasen sind (i) Proof-reading bei der Replikation (ii) Initiation der Transkription durch Aufwinden der RNA und Verhinderung von Loop-Bildung hinter der RNA Polymerase (iii) Initiation der Translation. Die Helikase des Vaccinia Virus ist essentiell für den Lebenszyklus des Virus und Nukleinsäure-spezifisch.

Es gibt Hinweise darauf, daß zumindest einige Helikasen sehr spezifisch aktivierbar sind. So brauchen z. B. DpbA aus E. coli (Fuller-Pace F.V., Nicol S.M., Reid A.D., Lane D.P., EMBO J 1993 12:3619-3626) und Slit22 aus Hefe (Xu D., Nouraini S., Field D., Tang S.J., Friesen J.D., Nature 1996 381: 709-716) spezifische RNA-Liganden zur Aktivierung.

Des weiteren werden DEAD-Box-Proteine in Assoziation mit Krankheiten beschrieben. Die Amplifizierung eines spezifischen Gens in Krebszellen (N-myc) steht in Verbindung mit der Tatsache, daß ein DEAD-Box-Protein mit N-myc co-amplifiziert wird, welches auf eine Rolle dieses Proteins in der Entartung von Krebszellen hinweist (George R.E., Kenyon R.M., McGuckin A.G., Malcolm A.J., Pearson A.D., Lunec J., Oncogene 1996 12: 1583-7). Mutationen einer RNA-Helikase stehen im Zusammenhang mit dem Werner-Syndrom - frühzeitige Alterung - (Yu C., Oshima J., Wijsman E.M., Nakura J. et al., Am J Hum Genet 1997 60: 330-341) und mit Xeroderma pigmentosum (Kobayashi T., Kuraoka I., Sailo M., Nakatsu Y., Tanaka A. et al., Hum Mut 1997 9: 322-331). Weiterhin ist ein möglicher

Zusammenhang zwischen DEAD-Box-Proteinen und Bindegewebskrankheiten postuliert worden (Valdez B.C., Henning D., Perlaky L., Busch R.K., Busch H., Biochem Biophys Res Commun 1997 234: 335-340). Bekannt ist außerdem ein

Zusammenhang zwischen defekter DNA Reparatur und einer Mutation in der

Helikasedomäne des XNP/ATR-X Gens (Villard L, Lossi AM, Cardoso C, Proud V, Chiaroni P, Colleaux L, Schwartz C, Fontes M Genomics 1997 43: 149-155).

Zusätzlich zu Helikasen aus Menschen oder aus diversen Krankheitserregern sind auch Helikasen aus Pflanzen von größtem Interesse. Einige DEAD-Box-Proteine

aus Pflanzen sind mittlerweile bekannt (Lorkovic Z.J., Herrmann R.G., Oelmüller R., Mol Cell Biol 1997 17: 2257-2265 und Aubourg et al., Gene 1997 199(1-2): 241-

253). Strukturell sind diese Proteine den DEAD-Box-Proteinen aus nicht pflanzlichen Organismen zwar ähnlich, bilden jedoch ein Untergruppe (Fig.3). Fig.3 zeigt die phylogenetische Verwandtschaft verschiedener eIF4A, eines der am besten

charakterisierten Mitglieder der DEAD-Box-Protein-Familie, aus verschiedenen

Organismen. Die pflanzlichen Proteine sind untereinander wesentlich näher verwandt als mit eIF4A aus tierischen Eukaryonten. Eine für die landwirtschaftliche Produktion interessante Anwendung ist die Stimulation der Aktivität Pflanzen-

spezifischer RNA-Helikasen zur Steigerung der Proteinexpression wirtschaftlich

relevanter Proteine. Dabei kann man entweder Pflanzen-eigene Helikasen stimulieren (z.B. durch Überexpression) oder Pflanzen-ähnliche Helikasen heterolog in Nutzpflanzen exprimieren.

Daher ist die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, neue Nukleinsäuren

bereitzustellen, die vorzugsweise für RNA-Helikasen kodieren.

Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß Nukleinsäuren kodierend für RNA-Helikasen bereitgestellt werden, welche vorzugsweise aus Ciliaten, besonders bevorzugt

Tetrahymena thermophila, gewonnen werden. Die erfindungsgemäßen

Nukleinsäuren kodieren für Expressionsprodukte, welche aus der Familie der DEAD-Box-Proteine stammen und somit auch für RNA-Helikasen.

Expressionsprodukte, vorzugsweise Proteine aus der DEAD-Proteinsuperfamilie im Sinne dieser Erfindung sind solche, die konservierte Motive besitzen, worunter ein konserviertes Motiv die Aminosäurereihenfolge DEAD enthält. Vorzugsweise enthalten die Proteine eine RNA-Helicase- und ATP-ase-Aktivität.

5

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher Nukleinsäuren kodierend für RNA Helikasen, mit einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No. 13 oder SEQ ID No. 15 oder eine funktionelle Variante davon, und Teile davon mit mindestens 8 Nukleotiden, vorzugsweise mit mindestens 15 oder 20 Nukleotiden, insbesondere mit mindestens 100 Nukleotiden, vor allem mit mindestens 300 Nukleotiden (nachfolgend „erfindungsgemäße Nukleinsäuren“ genannt).

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure mit der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No. 13 (im folgendem „Hc1“) kodiert für eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No. 14.

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure mit der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No. 15 (im folgendem „Hc2“) kodiert für eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No. 16.

20

Die Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren in E. coli führte zu einem Expressionsprodukt, welches ähnliche enzymatische Aktivitäten wie die einer RNA Helikase zeigt. Weitere Experimente gemäß der vorliegenden Erfindung bestätigten, daß es sich bei der Nukleinsäure um eine Nukleinsäure handelt, die für eine RNA-Helikase kodiert, insbesondere aufgrund des Vorliegens der charakteristischen Homologieboxen, wie in SEQ ID No. 14 und SEQ ID No. 16, die in Figur 1 wiedergegeben sind.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Nukleinsäure eine DNA oder RNA, vorzugsweise eine doppelsträngige DNA, und insbesondere eine DNA mit einer Nukleinsäuresequenz kodierend für RNA-Helikasen.

30

Unter dem Begriff „funktionelle Variante“ versteht man gemäß der vorliegenden Erfindung eine Nukleinsäure, die funktionell mit RNA Helikasen mit den beschriebenen Homologieboxen verwandt ist.

- 5 Im weiteren Sinne versteht man unter dem Begriff „Varianten“ gemäß der vorliegenden Erfindung Nukleinsäuren, die eine Homologie, insbesondere eine Sequenzidentität von ca. 60%, vorzugsweise von ca. 75%, insbesondere von ca. 90% und vor allem von ca. 95% aufweisen.
- 10 Die Teile der erfindungsgemäßen Nukleinsäure können beispielsweise zur Herstellung einzelner Epitope, als Sonden zur Identifizierung weiterer funktioneller Varianten oder als Antisense-Nukleinsäuren verwendet werden. Beispielsweise eignet sich eine Nukleinsäure aus mindestens ca. 8 Nukleotiden als Antisense-Nukleinsäure, eine Nukleinsäure aus mindestens ca. 15 Nukleotiden als Primer beim
- 15 PCR-Verfahren, eine Nukleinsäure aus mindestens ca. 20 Nukleotiden für die Identifizierung weiterer Varianten und eine Nukleinsäure aus mindestens ca. 100 Nukleotiden als Sonde.

Insbesondere können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren verwendet werden,

20 um komplementäre bzw. Antisense Nukleinsäuren zu konstruieren, die mit Hc1 oder Hc2 selbst oder mit verwandten Nukleinsäuren hybridisieren. Das Einbringen der komplementären bzw. Antisense Nukleinsäuren in die Zielzelle verhindert die Expression verwandter RNA-Helikasen, oder verwandter Expressionsprodukte.

25 Anti-Sense Nukleinsäuren, welche aus den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren erhältlich sind, können daher zur spezifischen Regulation der Genexpression verwendet werden. Dabei kann entweder die Zielzelle mit dem Anti-Gen nach bekannten Methoden transfiziert werden, welches dann in der Zelle transkribiert wird oder in vitro synthetisierte Antisense-RNA oder DNA wird über Mikroinjektion in die

30 Zielzelle eingebracht. Es ist bekannt daß Genexpression inhibiert werden kann durch Anti-Sense-RNA die komplementär zum kodierenden Bereich der

Ziel-mRNA ist. Der aus mRNA und Anti-Sense-RNA gebildete Duplexstrang ist dem schnellen Abbau durch RNAsen zugänglich.

Die Hemmung von Transkription und Translation durch die dargelegte Antisense-
5 Technik wurde auch erfolgreich in Pflanzenzellen durchgeführt (van der Krol A.R. et al. Nature 1988 333: 866).

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die erfindungsgemäße Nukleinsäure eine oder mehrere nicht-kodierende Sequenzen und / oder eine
10 Poly(A)-Sequenz. Die nicht-kodierenden Sequenzen sind beispielsweise Intronsequenzen oder regulatorische Sequenzen, wie Promotor- oder Enhancer-Sequenzen, zur kontrollierten Expression der Expressionsprodukte vorzugsweise von RNA-Helikasen.

15 In einer weiteren Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Nukleinsäure daher in einem Vektor, vorzugsweise in einem Expressionsvektor oder gentherapeutisch wirksamen Vektor enthalten.

Die Expressionsvektoren können beispielsweise prokaryotische oder eukaryotische
20 Expressionsvektoren sein. Beispiele für prokaryotische Expressionsvektoren sind für die Expression in E. coli z.B. der T7 Expressionsvektor pGM10 oder pGEX-4T-1 GST (Pharmacia Biotech), welcher für einen N-terminalen Met-Ala-His6-Tag kodiert, der eine vorteilhafte Reinigung des exprimierten Proteins über eine Ni²⁺-NTA-Säule ermöglicht. Als eukaryotische Expressionsvektoren für die Expression in
25 Saccharomyces cerevisiae eignen sich z.B. die Vektoren p426Met25 oder p426GAL1 (Mumberg et al. (1994) Nucl. Acids Res., 22, 5767), für die Expression in Insektenzellen z.B. Baculovirus-Vektoren wie in EP-B1-0127839 oder EP-B1-0549721 offenbart, und für die Expression in Säugerzellen z.B. SV40-Vektoren, welche allgemein erhältlich sind.

30 Im allgemeinen enthalten die Expressionsvektoren auch für die Wirtszelle geeignete regulatorische Sequenzen, wie z.B. den trp-Promotor für die Expression in E. coli

(s. z.B. EP-B1-0154133) in *E. coli*, den ADH-2-Promotor für die Expression in Hefen (Russel et al. (1983), J. Biol. Chem. 258, 2674), den Baculovirus-Polyhedrin-Promotor für die Expression in Insektenzellen (s. z.B. EP-B1-0127839) oder den frühen SV40-Promotor oder LTR-Promotoren z.B. von MMTV (Mouse Mammary Tumour Virus; Lee et al. (1981) Nature, 214, 228).

Die so gewonnenen rekombinanten Proteinen werden mit geeigneten Methoden aufgereinigt (z.B. Affinitätschromatographie, HPLC, FPLC) und in Lösung gebracht (Guanidin, Harnstoff). Die Charakterisierung der Proteinen und die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgt mit Hilfe etablierter Tests (RNA-Bindung, ATPase-Aktivität, Helikase-Aktivität).

Beispiele von gentherapeutisch wirksamen Vektoren sind Virusvektoren, vorzugsweise Adenovirusvektoren, insbesondere replikationsdefiziente Adenovirusvektoren, oder Adenoassoziierte Virusvektoren, z. B. ein Adenoassoziiierter Virusvektor, der ausschließlich aus zwei insertierten terminalen Wiederholungssequenzen (ITR) besteht.

Geeignete Adenovirusvektoren sind beispielsweise in McGrory, W.J. et al. (1988) Virol. 163, 614; Gluzman, Y. et al. (1982) in „Eukaryotic Viral Vectors“ (Gluzman, Y. ed.) 187, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York; Chroboczek, J. et al. (1992) Virol. 186, 280; Karlsson, S. et al. (1986) EMBO J. 5, 2377 oder WO95/00655 beschrieben.

Geeignete Adeno-assoziierte Virusvektoren sind beispielsweise in Muzyczka, N. (1992) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 158, 97; WO95/23867; Samulski, R.J. (1989) J. Virol, 63, 3822; WO95/23867; Chiorini, J.A. et al. (1995) Human Gene Therapy 6, 1531 oder Kotin, R.M. (1994) Human Gene Therapy 5, 793 beschrieben.

Gentherapeutisch wirksame Vektoren lassen sich auch dadurch erhalten, daß man die erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Liposomen komplexiert. Hierzu eignen sich Lipidmischungen wie bei Felgner, P.L. et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci, USA 84,

7413; Behr, J.P. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6982; Felgner, J.H. et al. (1994) J. Biol. Chem. 269, 2550 oder Gao, X. & Huang, L. (1991) Biochim. Biophys. Acta 1189, 195 beschrieben. Bei der Herstellung der Liposomen wird die DNA ionisch auf der Oberfläche der Liposomen gebunden, und zwar in einem solchen Verhältnis, daß eine positive Nettoladung verbleibt und die DNA vollständig von den Liposomen komplexiert wird.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können beispielsweise chemisch anhand der in SEQ ID No. 13 und SEQ ID No. 15 offenbarten Sequenz oder anhand der in SEQ ID No. 14 und SEQ ID No. 16 offenbarten Peptidsequenz unter Heranziehen des genetischen Codes z. B. nach der Phosphotriester-Methode synthetisiert werden (s. z.B. Uhlman, E. & Peyman, A. (1990) Chemical Reviews, 90, 543, No. 4).

Eine weitere Möglichkeit, die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren selbst und Varianten zu erhalten, ist die Isolierung aus einer geeigneten Genbank, anhand einer geeigneten Sonde (s. z.B. Sambrook, J. et al. (1989) Molecular Cloning. A laboratory manual. 2nd Edition, Cold Spring Harbor, New York). Als Sonde eignen sich beispielsweise einzelsträngige DNA-Fragmente mit einer Länge von ca. 100 bis 1000 Nucleotiden, vorzugsweise mit einer Länge von ca. 200 bis 500 Nucleotiden, insbesondere mit einer Länge von ca. 300 bis 400 Nucleotiden, deren Sequenz aus der Nukleinsäuresequenz gemäß Figur 4 und 6 abgeleitet werden kann.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren zur spezifischen Beeinflussung der Proteinbiosynthese.

Experimente zeigen, daß eine gesteigerte Helikase-Aktivität zu einer verstärkten Aufwindung der Ziel-RNA führt. Hierdurch wird die Ziel-RNA zugänglich für Bindungspartner, wie Proteine, insbesondere Enzyme oder Enzymkomplexe für die ribosomale Translation oder für den Abbau durch das Degradasom. Daraus folgt, je nach Ziel-RNA a) eine gesteigerte Translation und daher eine gesteigerte Proteinbiosynthese b) ein schnellerer Abbau durch das Degradasom und somit eine verringerte Proteinbiosynthese. Eine Hemmung der Helikase-Aktivität kann den

Abbau durch das Degradasom hemmen und zu einer verminderten Proteinbiosynthese führen. Grundlage hierfür ist die Erkenntnis, daß durch die selektive Hemmung oder Aktivierung von Helikasen wichtige biosynthetische Prozesse gezielt reguliert werden können.

5

Die Nukleinsäuren werden hierzu rekombinant in geeigneten Zielorganismen wie beschrieben exprimiert.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, vorzugsweise Hc1, sind ein hervorragendes Modell für diverse eukaryontische RNA-Helikasen, vorzugsweise aus Menschen und Parasiten (Figur 3A). Die genetische Verwandtschaft von Hc1 zu relevanten eukaryontischen Helikasen ist eng genug, um von Versuchen mit Hc1 Rückschlüsse auf Struktur und Funktion anderer eukaryontischer Helikasen (z.B. menschlichen) zu ziehen. Figur 3A zeigt die genetische Verwandtschaft einiger Helikasen aus verschiedenen Organismen im Vergleich zu Hc1. Besonders überraschend ist die große strukturelle Ähnlichkeit zwischen Hc1 und Säugetierhelikasen aus Mensch und Maus und der große strukturelle Unterschied zwischen Hc1 und bekannten viralen Helikasen.

Aufgrund phylogenetischer Untersuchungen gemäß Figur 3B erweist sich die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, vorzugsweise Hc2, als ein hervorragendes Modell für diverse eukaryontische RNA-Helikasen, vorzugsweise aus Pflanzen. Figur 3B zeigt die genetische Verwandtschaft einiger RNA Helikasen aus verschiedenen Organismen im Vergleich zu Hc2. Besonders überraschend ist die große strukturelle Ähnlichkeit zwischen Hc2 und RNA Helikasen aus Pflanzen. Die rekombinante Expression von Hc2 ermöglicht die Nutzung dieses neuen Enzyms als Modell zur Erforschung insbesondere pflanzlicher Helikasen, deren Struktur und Funktion, sowie zur Entwicklung geeigneter Inhibitoren bzw. Aktivatoren diese wichtigen Enzyme. So wurde für PRH75 aus Spinat postuliert, daß dieses Enzym ein sehr spezifischen RNA-Liganden braucht, um aktiv zu sein (Lorkovic Z.J., Herrmann R.G., Oelmüller R., Mol Cell Biol 17(4): 2257-2265 (1997)).

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher die gezielte heterologe Expression - mittels Überexpression nach bekannten Methoden - der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, vorzugsweise Hc2, in geeigneten Nutzpflanzen zur potentiellen Steigerung der Biosynthese relevanter Proteine.

5

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, vorzugsweise Hc2, können über rekombinante DNA-Technologien in Pflanzen eingebracht werden. Als Methode kann das Einschleusen des Fremdgens mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* benutzt werden. Hierbei wird das Fremdgen in das Genom der Bakteriums in bekannter Weise eingebracht. Bei Infektion der Zielpflanze werden die Gene des Bakteriums inklusive des Fremdgens stabil in das Genom der Pflanze integriert (Chilton M.D. et al., Cell 1977 11:263, Barton K.A. et al., Cell 1983 32: 1033). Diese Methode wird vorzugsweise für die Transformation von Dikotelydonen eingesetzt. Zur Transformation von Monokotelydonen können die bekannten Methoden wie Kalziumphosphat- Präzipitation, PEG Behandlung, Elektroporation, oder eine Kombination dieser Methoden eingesetzt werden (Potrykus I. et al., Mol Gen Genet 1985 199:183; Lorz H. et al., Mol Gen Genet 1985 199: 178; Fromm M et al. Nature 1986 319:791; Uchimiya H. et al., Mol Gen Genet 1986 204: 204). Möglich ist auch ein Einbringen der Fremd-DNA in die Pflanzenzelle mit Hilfe der sogenannten Gene-Gun (Klein T.M. et al. Nature 1987 327: 70).

20

Eine weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der Nukleinsäuren als Selektionsmarker in der Molekularbiologie. Konventionell verwendete Selektionsmarker sind Antibiotika. Molekularbiologisch veränderte Organismen tragen ein Gen, das Resistenz gegen ein Antibiotikum verleiht. Die Organismen werden in Antibiotika-haltigem Medium angezogen, so daß sich nur die Träger des Resistenzgens entwickeln können. Analog kann man Helikasegene als „Resistenzgene“ verwenden. Es wurde gezeigt (Müllner et al, Patentanmeldung DPA 19545126.0), daß die Überexpression eines Helikasegens bei Mauszellen diesen Zellen Toleranz gegenüber einer sonst toxischen Substanz, Leflunomid, verleiht. Es ist somit möglich, die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren als Selektionsmarker in der Molekularbiologie einzusetzen, wobei mit einem geeigneten Vektor, wie

25

30

beschrieben, die erfindungsgemäße Nukleinsäuren in Zellen einzuschleusen sind und mit einer geeigneten Substanz, wie Leflunomid); gegen die die Zellen durch Überexpression der Helikase tolerant sind, zu selektionieren.

- 5 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch die Expressionsprodukte, vorzugsweise Polypeptide und Polypeptidfragmente (die Hc1 und Hc2 kodieren) selbst, mit Aminosäuresequenzen gemäß SEQ ID No. 14 und SEQ ID No. 16 oder einer funktionellen Variante davon, und Teile davon mit mindestens sechs Aminosäuren, vorzugsweise mit mindestens 12 Aminosäuren, 10 insbesondere mit mindestens 65 Aminosäuren und vor allem mit 257 Aminosäuren Hc1 und 255 Aminosäuren Hc2 (nachfolgend „erfindungsgemäße Polypeptide“ genannt). Beispielsweise kann ein ca. 6-12, vorzugsweise ca. 8 Aminosäuren-langes Polypeptid ein Epitop enthalten, das nach Kopplung an einen Träger zur Herstellung von spezifischen poly- oder monoklonalen Antikörper dient (siehe 15 hierzu z. B. US 5,656,435). Polypeptide mit einer Länge von mindestens ca. 65 Aminosäuren können auch direkt ohne Träger zur Herstellung von poly- oder monoklonalen Antikörper dienen.

Unter dem Begriff „funktionelle Variante“ im Sinne der vorliegenden Erfindung 20 versteht man Polypeptide, die funktionell mit den erfindungsgemäßen Peptiden verwandt sind, d.h. eine RNA-Helikaseaktivität aufweisen. Unter Varianten versteht man auch allelische Varianten oder Polypeptide, die von anderen Zellen bzw. Gewebe abstammen.

- 25 Im weiteren Sinne versteht man darunter auch Polypeptide, die eine Sequenzhomologie, insbesondere eine Sequenzidentität von ca. 70%, vorzugsweise von ca. 80%, insbesondere von ca. 90%, vor allem von ca. 95% zu den Polypeptiden mit den Aminosäuresequenzen gemäß Figur 5 und 7 haben. Ferner zählen hierzu auch Deletion des Polypeptids im Bereich von ca. 1 - 60, 30 vorzugsweise von ca. 1 - 30, insbesondere von ca. 1 - 15, vor allem von ca. 1 - 5 Aminosäuren. Hierzu zählen hierzu auch Fusionsproteine, die die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Polypeptide enthalten, wobei die

Fusionsproteine selbst bereits die Funktion einer RNA-Helikase haben oder erst nach Abspaltung des Fusionsanteils die spezifische Funktion bekommen können. Vor allem zählen hierzu Fusionsproteine mit einem Anteil von insbesondere nicht-humanen Sequenzen von ca. 1 - 200, vorzugsweise ca. 1 - 150, insbesondere ca. 1 - 100, vor allem ca. 1 - 50 Aminosäuren. Beispiele von nicht-humanen Peptidsequenzen sind prokaryotische Peptidsequenzen, z.B. aus der Galactosidase von E. coli oder ein sogenannter Histidin-Tag, z.B. ein Met-Ala-His₆-Tag. Ein Fusionsprotein mit einem sogenannten Histidin-Tag eignet sich besonders vorteilhaft zur Reinigung des exprimierten Proteins über Metallionen-haltige Säulen, beispielsweise über eine Ni²⁺-NTA-Säule. „NTA“ steht für den Chelator „nitrilotriacetic acid“ (Qiagen GmbH, Hilden).

Die Teile des erfindungsgemäßen Polypeptids repräsentieren beispielsweise Epitope, die spezifisch von Antikörpern erkannt werden können.

Durch Vergleich mit bekannten Helikasen wurde gefunden, daß die erfindungsgemäßen Polypeptide ein Mitglied der sogenannten DEAD-Superproteinfamilie ist. Figur 1 zeigt die konservierten Motive, die für diese Klasse von RNA-Helikasen charakteristisch sind. All diese Motive sind innerhalb der Familie hoch konserviert und werden auch in den erfindungsgemäßen Polypeptiden gefunden.

Das erfindungsgemäße Polypeptid wird beispielsweise durch Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in einem geeigneten Expressionssystem, wie oben bereits beschrieben, nach dem für den Fachmann allgemein bekannten Methoden hergestellt. Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung bezieht sich daher auf ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Polypeptids, wobei eine erfindungsgemäße Nukleinsäure in einer geeigneten Wirtszelle exprimiert und gegebenenfalls isoliert wird.

Insbesondere die genannten Teile des Polypeptids können auch mit Hilfe der klassischen Peptidsynthese (Merrifield-Technik) synthetisiert werden. Sie eignen

sich insbesondere zur Gewinnung von Antiseren, mit deren Hilfe geeignete Genexpressionsbanken durchsucht werden können, um so zu weiteren funktionellen Varianten des erfindungsgemäßen Polypeptids zu gelangen.

- 5 Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung bezieht sich auch auf Antikörper, die mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid spezifisch reagieren, wobei die oben genannten Teile des Polypeptids entweder selbst immunogen sind oder durch Koppelung an geeignete Träger, wie z.B. bovines Serumalbumin, immunogen gemacht bzw. in ihrer Immunogenität gesteigert werden können.

- 10 Die Antikörper sind entweder polyklonal oder monoklonal. Die Herstellung, die auch einen Gegenstand der vorliegenden Erfindung darstellt, erfolgt beispielsweise nach allgemein bekannten Methoden durch Immunisieren eines Säugetiers, beispielsweise eines Kaninchens, mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid oder den
15 genannten Teilen davon, gegebenenfalls in Anwesenheit von z.B. Freund's Adjuvant und / oder Aluminiumhydroxidgelen (s. z.B. Diamond, B.A. et al. (1981) The New England Journal of Medicine, 1344). Die im Tier aufgrund einer immunologischen Reaktion entstandenen polyklonalen Antikörper lassen sich anschließend nach allgemein bekannten Methoden leicht aus dem Blut isolieren und z. B. über
20 Säulenchromatographie reinigen.

Monoklonale Antikörper können beispielsweise nach der bekannten Methode von Winter & Milstein (Winter, G. & Milstein, C. (1991) Nature, 349, 293) hergestellt werden.

- 25 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Arzneimittel, das eine erfindungsgemäße Nukleinsäure oder ein erfindungsgemäßes Polypeptid und gegebenenfalls geeignete Zusatz- oder Hilfsstoffe enthält und ein Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Krebs, Autoimmunkrankheiten,
30 insbesondere Multiple Sklerose oder Rheumatoide Arthritis, Alzheimer-Krankheit, Allergien, insbesondere Neurodermitis, Typ I Allergien oder Typ IV Allergien, Arthrose, Atherosklerose, Osteoporose, akute und chronische Infektionskrankheiten

und / oder Diabetis und / oder zur Beeinflussung des Zellmetabolismus, insbesondere bei der Immunsuppression, vor allem bei Transplantationen und / oder Erbkrankheiten, insbesondere Werner Syndrom, Bloom Syndrom, Xeroderma pigmentosa, Bindegewebskrankheiten, bei dem eine erfindungsgemäße

5 Nukleinsäure, beispielsweise eine sogenannten Antisense-Nukleinsäure, oder ein erfindungsgemäßes Polypeptid mit pharmazeutisch annehmbaren Zusatz- und / oder Hilfsstoffen formuliert wird.

Für die gentherapeutische Anwendung beim Menschen ist vor allem ein Arzneimittel

10 geeignet, das die erfindungsgemäße Nukleinsäure in nackter Form oder in Form eines der oben beschriebenen gentherapeutisch wirksamen Vektoren oder in mit Liposomen komplexierter Form enthält.

Als geeignete Zusatz- und / oder Hilfsstoffe eignen sich z. B. eine physiologische

15 Kochsalzlösung, Stabilisatoren, Proteinaseinhibitoren, Nukleaseinhibitoren etc.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Diagnostikum enthaltend die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, die erfindungsgemäßen Polypeptide oder erfindungsgemäße Antikörper und gegebenenfalls geeignete

20 Zusatz- und / oder Hilfsstoffe und ein Verfahren zur Herstellung eines Diagnostikums zur Diagnose von Krebs, Autoimmunkrankheiten, insbesondere Multiple Sklerose oder Rheumatoide Arthritis, Alzheimer-Krankheit, Allergien, insbesondere Neurodermitis, Typ I Allergien oder Typ IV Allergien, Arthrose, Atherosklerose, Osteoporose, akute und chronische Infektionskrankheiten und /

25 oder Diabetis und / oder zur Analyse des Zellmetabolismus, insbesondere des Immunstatus, vor allem bei Transplantationen und / oder zur Analyse von Erbkrankheiten, insbesondere Werner Syndrom, Bloom Syndrom, Xeroderma pigmentosa, Bindegewebskrankheiten, bei dem eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder erfindungsgemäße

30 Antikörper mit geeigneten Zusatz- und / oder Hilfsstoffen versetzt werden. Beispielsweise können gemäß der vorliegenden Erfindung anhand der erfindungsgemäßen Nukleinsäure ein Diagnostikum auf der Basis der

Polymerasekettenreaktion (PCR-Diagnostik, z.B. gemäß EP-0200362) oder eines Northern Blots hergestellt werden. Diese Tests beruhen auf der spezifischen Hybridisierung der erfindungsgemäßen Nukleinsäure mit dem komplementären Gegenstrang üblicherweise der entsprechenden mRNA. Die erfindungsgemäße Nukleinsäure kann hierbei auch modifiziert sein, wie z.B. in EP0063879 beschrieben. Vorzugsweise wird ein erfindungsgemäßes DNA-Fragment mittels geeigneter Reagenzien, z.B. radioaktiv mit α -P32-dATP oder nicht-radioaktiv mit Biotin, nach allgemein bekannten Methoden markiert und mit isolierter RNA, die vorzugsweise an geeignete Membranen aus z.B. Zellulose oder Nylon gebunden wurde, inkubiert. Zudem ist es vorteilhaft, die isolierte RNA vor der Hybridisierung und Bindung an eine Membran der Größe nach, z.B. mittels Agarose-Gelelektrophorese, aufzutrennen. Bei gleicher Menge an untersuchter RNA aus jeder Gewebeprobe kann somit die Menge an mRNA bestimmt werden, die spezifisch durch die Sonde markiert wurde.

15

Ein weiteres Diagnostikum enthält das erfindungsgemäße Polypeptid bzw. die oben näher beschriebenen immunogenen Teile davon. Das Polypeptid bzw. Teile davon, die vorzugsweise an eine Festphase, z. B. aus Nitrocellulose oder Nylon, gebunden sind, können beispielsweise mit der zu untersuchenden Körperflüssigkeit z. B. Blut, in vitro in Berührung gebracht werden, um so beispielsweise mit Autoimmunantikörper reagieren zu können. Der Antikörper-Peptid-Komplex kann anschließend beispielsweise anhand markierter Antihuman-IgG- oder Antihuman-IgM-Antikörper nachgewiesen werden. Bei der Markierung handelt es sich beispielsweise um ein Enzym, wie Peroxidase, das eine Farbreaktion katalysiert. Die Anwesenheit und die Menge an anwesenden Autoimmunantikörpern kann somit über die Farbreaktion leicht und schnell nachgewiesen werden.

25

Ein anderes Diagnostikum enthält die erfindungsgemäßen Antikörper selbst. Mit Hilfe dieser Antikörper kann beispielsweise eine Gewebeprobe des Menschen leicht und schnell dahingehend untersucht werden, ob das betreffende Polypeptid vorhanden ist. In diesem Fall sind die erfindungsgemäßen Antikörper beispielsweise mit einem Enzym, wie oben bereits beschrieben, markiert. Der spezifische

30

Antikörper-Peptid-Komplex kann dadurch leicht und ebenso schnell über eine enzymatische Farbreaktion nachgewiesen werden.

Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft auch einen Test zur

- 5 Identifizierung funktioneller Interaktoren, wie z.B. Inhibitoren oder Stimulatoren, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder die erfindungsgemäßen Antikörper und gegebenenfalls geeignete Zusatz- und / oder Hilfsstoffe.

- 10 Ein geeigneter Test zur Identifizierung funktioneller Interaktoren ist z. B. das sogenannte „Two-Hybrid System“ (Fields, S. & Sternglanz, R. (1994) Trends in Genetics, 10, 286). Bei diesem Test wird eine Zelle, beispielsweise eine Hefezelle, mit einem oder mehreren Expressionsvektoren transformiert oder transfiziert, die ein Fusionsprotein exprimieren, das das erfindungsgemäße Polypeptid und eine DNA-
- 15 Bindedomäne eines bekannten Proteins, beispielsweise von Gal4 oder LexA aus E. coli, enthält und / oder ein Fusionsprotein exprimieren, das ein unbekanntes Polypeptid und eine Transkriptions-Aktivierungsdomäne, beispielsweise von Gal4, Herpesvirus VP16 oder B42, enthält. Zudem enthält die Zelle ein Reportergen, beispielsweise das LacZ-Gen aus E. coli, „Green Fluorescence Protein“ oder die
- 20 Aminosäure-Biosynthesegene der Hefe His3 oder Leu2, das durch regulatorische Sequenzen, wie z.B. den lexA-Promotor/Operator oder durch eine sogenannte „Upstream Activation Sequence“ (UAS) der Hefe kontrolliert wird. Das unbekannte Polypeptid wird beispielsweise durch ein DNA-Fragment kodiert, das aus einer Genbank, beispielsweise aus einer humanen Genbank, stammt. Üblicherweise wird
- 25 gleich eine cDNA-Genbank mit Hilfe der beschriebenen Expressionsvektoren in Hefe hergestellt, so daß der Test unmittelbar danach durchgeführt werden kann.

Beispielsweise wird in einem Hefe-Expressionsvektor die erfindungsgemäße

Nukleinsäure in funktioneller Einheit an die Nukleinsäure kodierend für die lexA-

- 30 DNA-Bindedomäne kloniert, so daß ein Fusionsprotein aus dem erfindungsgemäßen Polypeptid und der LexA-DNA-Bindedomäne in der transformierten Hefe exprimiert wird. In einem anderen Hefe-Expressionsvektor werden cDNA-Fragmente aus einer

cDNA-Genbank in funktioneller Einheit an die Nukleinsäure kodierend für die Gal4-Transkriptions-Aktivierungsdomäne kloniert, so daß ein Fusionsprotein aus einem unbekannten Polypeptid und der Gal4-Transkriptions-Aktivierungsdomäne in der transformierten Hefe exprimiert wird. Die mit beiden Expressionsvektoren
5 transformierte Hefe, die beispielsweise Leu2- ist, enthält zusätzlich eine Nukleinsäure, die für Leu2 kodiert, und durch den LexA-Promotor/Operator kontrolliert wird. Im Falle einer funktionellen Interaktion zwischen dem erfindungsgemäßen Polypeptid und dem unbekannten Polypeptid bindet die Gal4-Transkriptions-Aktivierungsdomäne über die LexA-DNA-Bindedomäne an den LexA-
10 Promotor/Operator, wodurch dieser aktiviert und das Leu2-Gen exprimiert wird. Dies hat zur Folge, daß die Leu2- Hefe auf Minimalmedium, das kein Leucin enthält, wachsen kann.

Bei Verwendung des LacZ- bzw. „Green Fluorescence Protein“-Reportergens
15 anstelle eines Aminosäure-Biosynthesegens kann die Aktivierung der Transkription dadurch nachgewiesen werden, daß sich blau- bzw. grün-fluoreszierende Kolonien bilden. Die Blau- bzw. Fluoreszenzfärbung läßt sich aber auch leicht im Spectrophotometer z.B. bei 585 nM im Falle einer Blaufärbung quantifizieren.

20 Auf diese Weise können Expressionsgenbanken leicht und schnell auf Polypeptide durchsucht werden, die mit den erfindungsgemäßen Polypeptiden interagieren. Anschließend können die gefundenen neuen Polypeptide isoliert und weiter charakterisiert werden.

25 Eine weitere Anwendungsmöglichkeit des „Two-Hybrid-Systems“ ist die Beeinflussung der Interaktion zwischen dem erfindungsgemäßen Polypeptid und einem bekannten oder unbekannten Polypeptid durch weitere Substanzen, wie z. B. chemische Verbindungen. Auf diese Weise lassen sich auch leicht neue wertvolle chemisch synthetisierbare Wirkstoffe auffinden, die als Therapeutikum eingesetzt
30 werden können. Die vorliegende Erfindung ist daher nicht nur auf ein Verfahren zum Auffinden von polypeptidartigen Interaktoren bestimmt, sondern erstreckt sich auch auf ein Verfahren zum Auffinden von Substanzen, die mit dem oben beschriebenen

Protein-Protein-Komplex interagieren können. Derartige peptidartige, wie auch chemische Interaktoren werden daher im Sinne der vorliegenden Erfindung als funktionelle Interaktoren bezeichnet, die eine inhibierende oder eine stimulierende Wirkung haben können.

5

Beschreibung der Figuren und der wichtigen Sequenzen.

Figur 1 zeigt schematisch die konservierten Bereiche (Homologieboxen) der Proteine aus der DEAD-Proteinsuperfamilie. Die Zahlen zwischen den Bereichen
10 geben die Abstände in Aminosäuren zwischen den Homoboxen an.

Figur 2 beschreibt schematisch die konservierten Bereiche und deren bekannten Funktionen der exprimierten Proteine nach Fuller Pace, F.V. (1994), supra.

15 Figur 3A und 3B beschreiben die phylogenetischen Bäume von Hc1 und Hc2 und stellt die evolutionäre Bezüge her. Die Erstellung dieser Figuren erfolgte mit dem Programm: Lasergene (Modul MegAlign 3.1.7) der Firma: DNASTAR Inc.; mit Hilfe des Clustal- Algorithmus (Higgins D.G, Sharp P.M., CABIOS (1989), Vol. 5, no.2, 151-153).

20

SEQ ID No. 13 zeigt die Nukleinsäuresequenz von Hc1.

SEQ ID No. 14 zeigt die korrespondierende Aminosäuresequenz zu SEQ No. 13.

25 SEQ ID No. 15 zeigt die Nukleinsäuresequenz von Hc2.

SEQ ID No. 16 zeigt die korrespondierende Aminosäuresequenz zu SEQ No. 15.

Die nachfolgenden Beispiele dienen zur näheren Erläuterung der Erfindung, ohne dieselbe auf in den Beispielen beschriebenen Produkte und Ausführungsformen einzuschränken.

5 Beispiele

Die praktische Arbeiten, die zur der vorliegenden Erfindung geführt haben, basieren in der Hauptsache auf etablierte, bekannte Methoden der Mikrobiologie, der Molekularbiologie und rekombinanter DNA Technologie.

10

Beispiel 1 : Kultur von *Tetrahymena thermophila*

Tetrahymena thermophila, Stamm B1868IV, wurde in PPYS-Medium (10 g/l Proteose Pepton Nr.3 DIFCO, 1 g/l Hefeextrakt DIFCO, 10 mg Natriumcitrat, 24,3 mg FeCl_3) im 500 ml Kolben angeimpft (100.000 Zellen/ml PPYS) und 2-3 Tage bei 15 25°C und 100-150 rpm inkubiert, bis zu einer Zelldichte von ca. 1 Mio/ml.

Beispiel 2 : Isolierung der mRNA

Aus 200 ml Schüttelkultur von *Tetrahymena thermophila*, Stamm B1868IV wurde nach Chomczynski & Sacchi, (1987) Gesamt-RNA isoliert. Dazu wurden ca. 2 Mio 20 Zellen in Gegenwart von Guanidin Thiocyanat / Sarkosyl / beta-Mercaptoethanol lysiert. Nach Zugabe von Natriumacetat und Chloroform/Isoamylalkohol/Phenol (25:24:1) wird gut gemischt, 15 min auf Eis inkubiert und danach 20 min bei 10.000xg, 4°C zentrifugiert. Die wässrige Phase wird mit 1 Volumen Isopropanol versetzt und mindestens 30 min bei -20°C stehen gelassen. Das RNA Pellet wird 25 durch Zentrifugation gewonnen (10 min, 10.000xg, 4°C). Das Pellet wird noch zweimal gewaschen, getrocknet und in DEPC-Wasser aufgenommen. Nach einer 10 - 15minütigen Inkubation bei 55-60°C kann die RNA bei -80°C aufgehoben werden. Aus der Gesamt-RNA wird über Oligo(dT)-Sepharose (Clontech mRNA Separator Kit #K1040-2) mRNA aufgereinigt

Beispiel 3 : Herstellung von cDNA

Die mRNA wurde nach CLONTECH in cDNA überschrieben (CapFinder™ PCR cDNA Library Construction Kit #K1051-1).

5 Beispiel 4: Amplifizierung spezifische Gen-Fragmente

Spezifische Gen-Fragmente wurden mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert. Ein Standard-PCR-Ansatz enthält 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001% Gelatine, 75 µM dNTP, 0.3 ng von jedem Primer, 0,5 µl cDNA, 0,5 U Taq Polymerase. Zur Amplifizierung des Fragmentes Hc1

10 wurden die Primer

(2) 5'-GTTCTACcATTCTGTG-3' und

(3) 5'-AcnGGTTCnGGTAAGAC-3' verwendet, zur Amplifizierung des Fragmentes Hc2 wurden die Primer

(4) 5'-ATAGAATTCCCnAcnAGAGAAcTnGCT-3' und

15 (8) 5'-ATAGGATCCGTTCTACcATTCTGTG-3' verwendet, wobei n ein beliebiges Nukleotid ist. Das PCR-Programm war 5 min 95°C, 95°C/37s - 50°C/37s - 72°C/37s - 30 Zyklen.

Beispiel 5: Klonierung und Sequenzierung der Fragmente

20 Nach PCR wird das PCR-Produkt auf 1%igem Agarosegel aufgetrennt. Die spezifischen Fragmente werden ausgeschnitten und mit QIAGEN Gel Extraction Kit aufgereinigt. Die gereinigten Fragmente werden direkt zur Klonierung eingesetzt (Invitrogen Original TA Cloning Kit #K2000-01). Positive Klone werden in Schüttelkultur vermehrt und die Plasmid-DNA mit QIAGEN Maxi-Prep-Kit

25 aufgereinigt. Sequenziert wird mit Automated Sequenzer AbiPrism Model 377.

Rekombinante Expression

Die Genfragmente Hc1 bzw. Hc2 werden in einen geeigneten Vektor kloniert, vorzugsweise pGEX-4T-1 GST-Fusionsvektor (Pharmacia Biotech). Dazu werden

30 Hc1 und Hc2 mit geeigneten Primern über PCR aus Tetrahymena thermophila cDNA hergestellt. Ein Standard-PCR-Ansatz enthält 10 mM Tris-HCl, pH 8.3,

50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001% Gelatine, 75 µM dNTP, 0.3 ng von jedem Primer, 0,5 µl cDNA, 0,5 U Taq Polymerase. Zur Amplifizierung des Fragmentes Hc1 wurden die Primer

(2A) 5' ATAAGAATGCGGCCGCTGTTCTACCGATTCTGTGAATATA 3'

5 (3A) 5' CGCGGATCCTC ACT GGT TCG GGT AAG ACT GCT ACT TTC TCT 3' verwendet, zur Amplifizierung des Fragmentes Hc2 wurden die Primer

(7A) 5' TATAGAATTCCCCACTAGAGAACTCGCTATGCAAATCGAA 3'

(8A) 5' ATAAGAATGCGGCCGCGTTCTACCGATTCTGTGGACATAG 3' verwendet.

Primer (2A) enthält eine NotI-Schnittstelle, (3A) eine BamHI- Schnittstelle, (7A) eine EcoRI- und (8A) ein NotI-Schnittstelle. Das PCR-Programm war 5 min 95°C, 10 95°C/37s - 50°C/37s - 72°C/37s - 30 Zyklen.

Die zu klonierenden Fragmente werden über ein 1%iges Agarosegel aufgereinigt (QIAgen Gelextraktion Kit) und die zu klonierenden Enden durch Verdau mit NotI und BamHI (Hc1) bzw. EcoRI und NotI (Hc2) vorbereitet. Der Vektor pGEX-4T-1 15 wird ebenfalls durch Verdau mit NotI und BamHI (Hc1) bzw. EcoRI und NotI (Hc2) vorbereitet. Vektor und Insert werden über Nacht bei 16°C ligiert, die Ligationsansätze werden zur Transformation von kompetenten TOP10F' (Invitrogen) E.coli Zellen eingesetzt. Positive Klone werden gepickt und zur Proteinexpression verwendet. Das Konstrukt pGEX-Hc1 bzw. pGEX-Hc2 erlaubt die Translation eines 20 Fusionsproteins bestehend aus 257 Aminosäuren (28,3 kDa) von Hc1 bzw. 255 Aminosäuren (28,1 kDa) von Hc2 und Glutathion-S-Transferase (24 kDa) . Das Fusionsprotein enthält alle Homologieboxen (DEAD, SAT,...) welche die Mitglieder der Proteinfamilie auszeichnen. Zur rekombinanten Proteinexpression wird eine Übernacht-Kultur mit IPTG induziert und das Fusionsprotein aus dem Überstand im 25 Batchverfahren mit Glutathion Sepharose 4B oder über eine Glutathion Sepharose 4B Säule aufgereinigt. Die Glutathion-S-Transferase wird mit Thrombin gespalten. Dazu werden z. B. 100 µg GST-Fusionprotein mit einer Einheit Thrombin Proteinase in 1x PBS bei 22°C für 16 Std. inkubiert. Das Genprodukt von Hc1 bzw. Hc2 wird 30 über Gelfiltration abgetrennt, z. B. mit einer Superdex 200 HR 10/30 Säule (Pharmacia Biotech). Als Standard kann der Gel Filtration Chromatography Standard von Biorad (Ref. 151-1901) verwendet werden.

Beispiel 6 : ATPase Aktivität

Die Aktivität wird bestimmt wie in der Literatur beschrieben, z.B. nach Jaramillo et al., Mol Cell Biol 1991 11:5992; Rozen et al., Mol Cell Biol 1990 10: 1134, Ladomery M. et al. Nucl. Acid Res. 1997, 25:965-973 oder Dong F. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996, 93: 14456-14461 oder Patent PCT/US97/01614. Nachfolgend wird ein konkretes Beispiel beschrieben. Die Reaktionsmischung zur Messung der ATPase Aktivität enthält 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 20 mM Hepes/KOH, pH 7, 1 mM Dithiothreitol, 1mM PMSF, 10 µM ATP und 0,2 µl 32P-ATP in einem Gesamtvolumen von 50 µl. Die Reaktionsmischung wird auf 37 °C erwärmt und Hc1 bzw. Hc2 wird dazugegeben. Nach 30 min bei 37 °C wird die Reaktion durch Zugabe von 400 µl 7% Aktivkohle in 50 mM HCl und 5 mM H₃PO₄ gestoppt. Die Proben werden gemischt, und 15 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Die freigesetzte Radioaktivität wird mit einem Scintillationszähler im Überstand gemessen.

Beispiel 7 : Helikaseaktivität

Die Helikase-Aktivität von Hc1 bzw. Hc2 kann mittels Dissoziation doppelsträngiger RNA verfolgt werden. Das Substrat kann ein beliebiges RNA-Oligomer sein, das an einem Strang markiert ist, z.B. mit 32P. Die Reaktionsmischung enthält in einem 10 µl Ansatz 32P-markiertes Helikasesubstrat, Hc1 bzw. Hc2 in verschiedenen Konzentrationen, 2 mM ATP, 5 mM Dithiothreitol und 50 µg bovines Serum Albumin in 20 mM Tris-HCl. Die Reaktion wird bei 37°C über 30 min durchgeführt und durch Erhitzen gestoppt.

Die Reaktionsmischung wird auf ein 16 cm X 18 cm 12% nicht-denaturierendes Polyacryamidgel aufgetragen und bei konstanter Stromstärke von 25 mA aufgetrennt. Das Gel wird unter Vakuum getrocknet und exponiert (z.B. Kodak RPYRP-5 Film, -70°C).

Beispiel 8 : Antisense

Die RNA-Gegenstränge der DNA-Fragmente Hc1, Hc2 oder von DNA-Sequenzen die homolog zu Hc1 oder Hc2 sind oder Teilsequenzen von Hc1, Hc2 oder Homologen können als Antisense-Stränge eingesetzt werden. Üblicherweise wird ein Plasmid konstruiert, welches die gewünschte Antisense-Sequenz trägt, sowie

Selektionsmarker, z.B. Neomycin, einen Promotor der die Expression der Antisense-RNA kontrolliert und RNA-stabilisierende Sequenzen. Die transkribierten Sequenzen werden in der Zelle transkribiert und das Transkript hybridisiert mit der Ziel-DNA.

Andererseits können in vitro synthetisierte Sequenzen auch durch Mikroinjektion in die Zelle gebracht werden.

Denkbar ist auch der Einsatz von Oligonukleotiden. Diese können entweder synthetisch hergestellt oder durch Restriktionsverdau von Hc1, Hc2 oder Homologen generiert werden. Die Oligonukleotide müssen hochrein sein. Dies erreicht man durch 2 - 5 maliges Lyophilisieren. Reine Oligonukleotide werden z. B. in HEPES gepufferter Saline, pH 7,4 aufgenommen.

Beispiel 9 : Gensonde zum Auffinden neuer Mitglieder der DEAD-Box-Protein-Familie

Die Fragmente Hc1 und Hc2 werden benutzt, um aus geeigneten Organismen neue DEAD-Box-Proteine zu isolieren. Dazu werden die spezifischen Gen-Fragmente mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert und gleichzeitig mit Digoxigenin markiert, nach Boehringer Mannheim PCR DIG Probe Synthesis Kit #1636 090. Als Template dient Plasmid-DNA der klonierten Fragmente Hc1 bzw. Hc2. Ein PCR-Ansatz enthält Expand™ High Fidelity Puffer (Boehringer Mannheim #1636 090), 200 µM dATP, 200 µM dGTP, 200 µM dCTP, 130 µM dTTP, 70 µM DIG-11-dUTP, 0.3 ng von jedem Primer, 100 pg Plasmid-DNA, 2,6 U Taq Polymerase.

Zur Amplifizierung des Fragmentes Hc1 wurden die Primer

(2) 5'-GTTCTACCNATTCTGTG-3' und

(3) 5'-ACnGGTTCnGGTAAGAC-3' verwendet, zur Amplifizierung des Fragmentes Hc2 wurden die Primer

(4) 5'-ATAGAATTCCCNACnAGAGAAAnTnGCT-3' und

(8) 5'-ATAGGATCCGTTCTACCNATTCTGTG-3' verwendet.

Das PCR-Programm war 5 min 95°C, 95°C/37s - 50°C/37s - 72°C/37s - 30 Zyklen.

Das PCR-Reaktionsgemisch, das die markierten Fragmente enthält, wird direkt für Hybridisierungsversuche eingesetzt. Dazu wird das PCR-Produkt 10 min bei 95°C denaturiert und mit der Hybridisierungslösung DIG Easy Hyb (Boehringer Mannheim Ref. 1603558) versetzt (Konz. 2 µl/ml). Mit dieser Hybridisierungslösung werden
5 cDNA-Banken geeigneter Organismen bei niedriger Stringenz (Hybridisierungstemperatur 30 - 50 °C) gescreent.

Beispiel 10: Antikörper

Rekombinant exprimiertes Protein wird nach einer geeigneten Methode aufgereinigt
10 und dazu benutzt, um in einem geeigneten Organismus, z. B. Ratte oder Kaninchen, polyklonale Antikörper zu generieren. Dazu wird das Fusionsprotein z. B. zunächst über Glutathion Sepharose und dann über SDS-PAGE aufgereinigt. Die Bande, die das Fusionsprotein enthält wird aus dem Gel ausgeschnitten, zermahlen und z. B. einem Kaninchen oder einer Ratte eingespritzt. Das erhaltene Antiserum wird über
15 eine IgG Säule gegeben, die Antikörper bei niedrigem pH in 1 M Tris-HCl pH 8 eluiert. Die Antikörper werden gegen 25 mM HEPES pH 7.9, 12 mM MgCl₂, 0,5 mM EDTA, 2 mM Dithiothreitol, 17% Glycerin, 100 mM KCl dialysiert.

Beispiel 11: Einsatz der Antikörper zum Isolieren neuer DEAD-Box-Proteine

20 Die wie im vorstehenden Abschnitt beschrieben erhaltenen Antikörper werden dazu verwendet aus geeigneten Organismen neue DEAD-Box Proteine zu isolieren. Dazu werden die Antikörper kovalent an eine geeignete Matrix gekoppelt, z.B. Sephadex G50 (Pharmacia). Mit dem Sephadex werden z.B. Biorad Säulen 1.5 x 10 cm oder 2.5 x 10 cm gepackt und mit 20 ml Puffer A (0.05 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 0.005 M
25 EDTA, 0.1% NP40, pH 8.0) equilibriert. Danach werden 3.0 g Protein A-Sepharose Beads (Pharmacia CL-4B) auf die Säule gegeben. Über Nacht bei 4°C stehen lassen. Die Antikörperlösung wird auf die Säule gegeben und bei 4°C mit einer Flußrate von ~100 ml/h durchtropfen gelassen. Danach wird die Säule mehrmals gewaschen: mit 250 ml Puffer A (plus 0.5%NP40), danach mit 125 ml 0.1 M Borat
30 Puffer, pH 9.0, danach mit 125 ml Borat Puffer pH8.0, danach mit 125 ml 0.2 M Triethanolamine, pH 8.2. Über Cross-linking wird die Fc-Region des Antikörpers an die Protein A-Sepharose gekoppelt. Danach wird die Säule nochmals gewaschen,

und zwar einmal mit Puffer B (0.15 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0, 10% Glycerol, 10 % NP-40), einmal mit Puffer C (0.05 M Tris-HCl, 0.5 M LiCl, 1 mM EDTA, pH 8.0, 10% Glycerol), und einmal mit Puffer D (0.01 M Pipes, 5 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0, 10% Glycerol). Der nicht gecrosslinkte Antikörper wird mit
5 Citratpuffer eluiert. Gelagert wird die Säule mit Borate Puffer, pH 8.0 mit 0.02% Na N3.

Um neue DEAD-Box Proteine zu isolieren wird Zelllysate geeigneter Organismen auf die Antikörpersäule gegeben. Die Säule wird mehrmals gewaschen und die
10 gebundenen Proteine mit einem geeigneten Puffer, z.B. Glycin, pH 3, in Tris-HCl, pH 8, eluiert.

Beispiel 12 : Überexpression in Nutzpflanzen

Die Genfragmente Hc1 und Hc2 können heterolog in Nutzpflanzen exprimiert
15 werden. Der Gentransfer kann beispielsweise über *Agrobacterium tumefaciens* vermittelt werden. Ein typischer *A. tumefaciens* Vektor (Ti-Plasmid) enthält einen Replikationsursprung (Ori-Agro), der die Replikation in *Agrobacterium* erlaubt, einen Replikationsursprung Ori-E. coli, der die funktionelle Replikation in *E. coli* gewährleistet, mehrere Resistenzgene, z. B. gegen Kanamycin und Spectinomycin,
20 Insertionsstellen für das Einbringen des Fremdgens und gerichtete T-DNA Randsequenzen, die beim Gentransfer die Erkennung von Anfang und Ende des Fremdgens gewährleisten. Mit dem Ti-Plasmid wird *A. tumefaciens* transformiert.

Zur Infizierung der Nutzpflanze werden von dieser Blattscheiben gestanzt, die in
25 eine flache Schale (Petrischale) gelegt werden. Anschließend fügt man eine Lösung von rekombinanten *Agrobakterien* hinzu und überführt nach einigen Minuten die Blattscheiben auf ein Medium mit Nährzellen (z.B. Filterpapier). Verwundete Zellen an den Rändern der Blattscheiben setzen Faktoren frei, die zur Infektion der Pflanzenzellen durch das *Agrobakterium* führen. Nach 2-3 Tagen werden die
30 Blattscheiben auf ein sproßstimulierendes Medium, das ein Antibiotikum enthält, welches die *Agrobakterien* abtötet (z. B. Cefotaxim), überführt und 2-3 Wochen

kultiviert. Die Sprosse werden auf ein wurzelinduzierendes Medium transferiert und nach weiteren 2-3 Wochen in Erde eingepflanzt.

Beispiel 13: Diagnostische Sonden

- 5 Die Genfragmente Hc1 oder Hc2 oder homologe Genfragmente oder Teile davon (Länge mindestens 20 Basenpaare), die die für RNA-Helikasen charakteristischen Homologieboxen enthalten, können als diagnostische Sonden eingesetzt werden. Dazu werden die DNA-Fragmente auf einer geeigneten Matrix immobilisiert (z. B. Nylonmembran, Chip). Die mRNA eines Patienten wird aufgereinigt und über
10 reverse Transkription, z.B. mit MMLV Reverser Transkriptase, 2 h bei 37°C, in cDNA umgeschrieben. Gleichzeitig wird die cDNA markiert, z.B. mit 32P oder Digoxigenin. Die cDNA wird in einem geeigneten Hybridisierungspuffer, z.B. DIG EasyHyb (Boehringer Mannheim Ref. 1603558) verdünnt und mit der immobilisierten DNA bei stringenten Bedingungen hybridisiert.

15

Beispiel 14: Selektionsmarker

- Die Genfragmente Hc1 und Hc2 können als Selektionsmarker in der Molekularbiologie eingesetzt werden. Es wurde gezeigt, daß die Überexpression einer RNA-Helikase in Mauszellen, diese tolerant gegen die Substanz Leflunomid
20 macht (Müllner-Patent). Um Hc1 oder Hc2 als Selektionsmarker zu verwenden, wird ein Expressionsvektor konstruiert, die Hc1 oder Hc2 enthält und ein zu exprimierendes Gen. Dabei kann das zu exprimierende Gen neben dem Helikase-Gen liegen oder dazwischen. Mit dem Vektor werden geeignete Wirtszellen transformiert (z.B. Klonierung in einen pGEX-Vektor und Einschleusen in E. coli).
25 Liegt das zu exprimierende Gen neben dem Hc-Gen werden die Transformanten bei erfolgreicher Einschleusung des Vektors tolerant gegen Leflunomid. Den Erfolg der Ligation muß man z. B. über Blue-White-Screening überprüfen. Liegt das zu exprimierende Gen in dem Hc-Gen wird das Hc-Gen bei erfolgreicher Ligation zerstört und die Transformanten verlieren bei erfolgreicher Einschleusung des
30 Vektors ihre Toleranz gegen Leflunomid.

Patentansprüche

1. Nukleinsäure kodierend für eine RNA-Helikase mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No. 13 oder eine funktionelle Variante davon, und Teile davon mit mindestens 8 Nukleotiden, wobei SEQ ID No. 13 Teil des Anspruchs ist.
2. Nukleinsäure kodierend für eine RNA-Helikase mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No. 15 oder eine funktionelle Variante davon, und Teile davon mit mindestens 8 Nukleotiden, wobei SEQ ID No. 15 Teil des Anspruchs ist.
3. Nukleinsäuren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuren eine DNA oder RNA, vorzugsweise eine doppelsträngige DNA ist.
4. Nukleinsäuren nach Anspruch 1 bis 3 erhältlich aus Ciliaten.
5. Nukleinsäuren nach Anspruch 4 erhältlich aus *Tetrahymena thermophila*.
6. DNA und RNA-Antisensestrang erhältlich aus Nukleinsäuren gemäß Anspruch 1 bis 5.
7. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure in einem Vektor, vorzugsweise in einem Expressionsvektor oder gentherapeutisch wirksamen Vektor, enthalten ist.
8. Verfahren zur Herstellung einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure chemisch synthetisiert oder anhand einer Sonde aus einer Genbank isoliert wird.
9. Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No. 14 oder eine funktionelle Variante davon, und Teile davon mit mindestens 6 Aminosäuren.

10. Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No. 16 oder eine funktionelle Variante davon, und Teile davon mit mindestens 6 Aminosäuren.
11. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids gemäß Anspruch 9 oder 10,
5 dadurch gekennzeichnet, daß eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 in einer geeigneten Wirtszelle exprimiert wird.
12. Antikörper gegen ein Polypeptid gemäß Anspruch 9 oder 10.
- 10 13. Verfahren zur Herstellung eines Antikörpers gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß ein Säugetier mit einem Polypeptid gemäß Anspruch 9 oder 10 immunisiert und gegebenenfalls die entstandenen Antikörper isoliert werden.
- 15 14. Arzneimittel enthaltend eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 9 oder 10 und gegebenenfalls pharmazeutisch annehmbare Zusatz- und / oder Hilfsstoffe.
- 20 15. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Krebs, Autoimmunkrankheiten, insbesondere Multiple Sklerose oder Rheumatoide Arthritis, Alzheimer-Krankheit, Allergien, insbesondere Neurodermitis, Typ I Allergien oder Typ IV Allergien, Arthrose, Atherosklerose, Osteoporose, akute und chronische Infektionskrankheiten und/oder Diabetis und / oder zur Beeinflussung des Zellmetabolismus, insbesondere bei der Immunsuppression,
25 vor allem bei Transplantationen und/oder Erbkrankheiten, insbesondere Werner Syndrom, Bloom Syndrom, Xeroderma pigmentosa, Bindegewebskrankheiten, dadurch gekennzeichnet, daß eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1-6 oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 9 oder 10 oder Antikörper gemäß Anspruch 12 mit einem pharmazeutisch annehmbaren Zusatz- und / oder
30 Hilfsstoff formuliert wird.

16. Diagnostikum enthaltend eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1-6 oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 9 oder 10 oder Antikörper gemäß Anspruch 12 und gegebenenfalls geeignete Zusatz- und / oder Hilfsstoffe.
- 5 17. Verfahren zur Herstellung eines Diagnostikums zur Diagnose von Krebs, Autoimmunkrankheiten, insbesondere Multiple Sklerose oder Rheumatoide Arthritis, Alzheimer-Krankheit, Allergien, insbesondere Neurodermitis, Typ I Allergien oder Typ IV Allergien, Arthrose, Atherosklerose, Osteoporose, akute und chronische Infektionskrankheiten und / oder Diabetis und/oder zur Analyse
10 des Zellmetabolismus, insbesondere des Immunstatus, vor allem bei Transplantationen und / oder zur Analyse von Erbkrankheiten, insbesondere Werner Syndrom, Bloom Syndrom, Xeroderma pigmentosa, Bindegewebskrankheiten, dadurch gekennzeichnet, daß eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 - 6 oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 9 oder
15 10 oder Antikörper gemäß Anspruch 12 mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger versetzt wird.
18. Test zur Identifizierung von funktionellen Interaktoren enthaltend eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 - 6 oder ein Polypeptid gemäß
20 Anspruch 9 oder 10 oder Antikörper gemäß Anspruch 12 und gegebenenfalls geeignete Zusatz- und / oder Hilfsstoffe.
19. Verwendung einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 - 6 oder eines Polypeptids gemäß Anspruch 9 oder 10 zur Identifizierung funktioneller
25 Interaktoren.
20. Verwendung einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 - 6 zum Auffinden von Varianten der RNA-Helikase, dadurch gekennzeichnet, daß eine Genbank mit der genannten Nukleinsäure abgesucht und die gefundene
30 Variante isoliert wird.

21. Verwendung der Nukleinsäuren gemäß einem der Ansprüche 1 - 6 oder eines Polypeptids gemäß Anspruch 9 oder 10 zur Beeinflussung der Proteinbiosynthese.
- 5 22. Verwendung der Nukleinsäuren und Polypeptide gemäß Anspruch 21 zur Hemmung der Degradation der mRNA und / oder Stimulation der Degradation der mRNA und / oder Stabilisierung von mRNA.
- 10 23. Verwendung der Nukleinsäuren und Polypeptide nach Anspruch 21 zur heterologen Expression in Nutzpflanzen.
24. Verwendung der Nukleinsäuren gemäß einem der Ansprüche 1 - 6 oder eines Polypeptids gemäß Anspruch 9 oder 10 als Selektionsmarker in der Molekularbiologie.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1/5

Fig. 1**DEAD-Proteinsuperfamilie**

	ATPase A Motif		ATPase B Motif	
NH ₂	-----AXXXGKT-----PTRELA-----GG-----TPGR-----DEAD-----SAT-----FXXXT-----			
	21-299	24-42	22-28	19-27 19-22 27-51 59-70 52-53
RGXD	-----HRIGRXXR-----COOH			
	20	24-236		
eIF-4A				
NH ₂	-----AXXXGKT-----PTRELA-----GG-----TPGR-----DEAD-----SAT-----FINT-----			
	75	24	22	20 20 27 62 52
RGID	-----HRIGRXXR-----COOH			
	20	41		

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2 / 5

Fig. 1 (Forts.)

DEAH-Unterfamilie

NH₂-----GXXXXXGKT-----RVAA-----XX-----TDGX-----DEAH-----SAT-----FXT-----
 245-505 22-24 29 7-8 19 28 58-61 75-84

XGXX-----QRIGRXGR-----COOH
 25 315-373

DEXH-Unterfamilie

NH₂-----XXXXXXGKT-----PTRXXX-----DEXH-----TAT-----FXXS-----
 81-1904 19-27 55-60 24-30 44-72 46-55

XGXX-----QRXGRXGR-----COOH
 38-44 155-1799

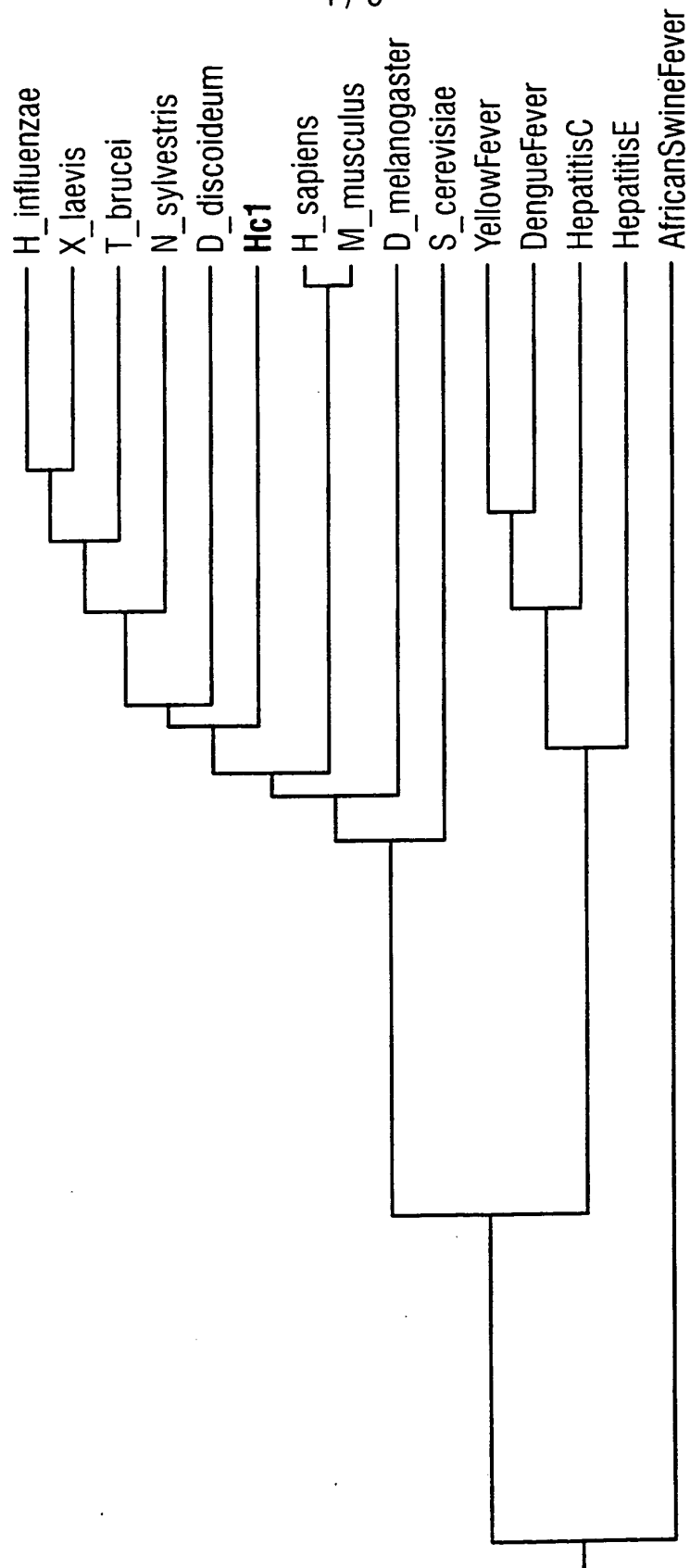
THIS PAGE BLANK (USPTO)

3 / 5

Fig. 2

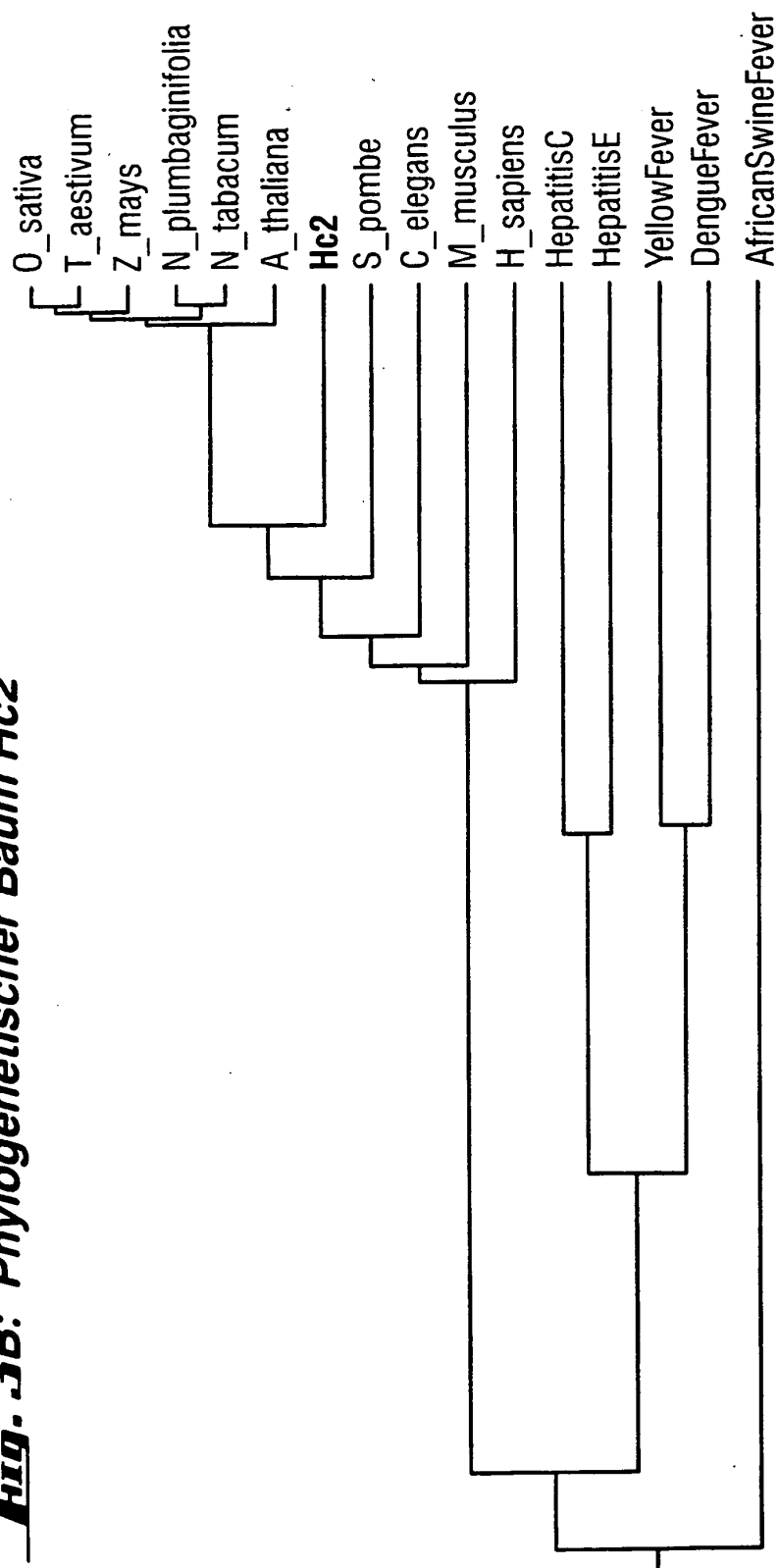
DEAD	NH ₂ ---	G-GKT---	PTRELA---	CG---	TPGR---	DEAD---	SAT---	RG-D-KRIGR-R-----	COOH	
DEAH	NH ₂ ---	G-GKT---	P-R---	A-----	T-G---	DEAR---	SAT---	R-GR-R-----	COOH	
DEXH	NH ₂ ---	G-GK---	P-R---	A-----	T-G---	DE-W---	SAT---	R-GR-R-----	COOH	
DEAH*	NH ₂ ---	G-GKT---	-----					DEAH---A-----	GR-----	COOH
Funktion:		ATP-Bindung				ATPase	ATPase	ATPase	RNA-Bindung	
						RNA-Helicase				

THIS PAGE BLANK (USPTO)



THIS PAGE BLANK (USPTO)

5 / 5

Fig. 3B: Phylogenetischer Baum Hc2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Aventis Research & Technologies Deutschland GmbH & Co KG
<120> Neue Gene der DEAD Box Protein-Familie, deren
Expressionsprodukte und Verwendung
<150> DE 198 20 608.9
<151> 1998-07-22
<160> 16

<210> 1
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificiel sequence
<220>
<223> cDNA

<400> 1

GTTCTACCAT TCTGTG

16

<210> 2
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificiel sequence
<220>
<223> cDNA

<400> 2

ACGGTTCGGT AAGAC

15

<210> 3
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificiel sequence
<220>
<223> cDNA

<400> 3

ATAGAATTCC CACAGAGAAT GCT

23

<210> 4
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificiel sequence
<220>
<223> cDNA

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<400> 4

2

ATAGGATCCG TTCTACCATT CTGTG

25

<210> 5

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificiel sequence

<220>

<223> cDNA

<400> 5

ATAAGAATGC GGCCGCTGTT CTACCGATTC TGTGAATATA

40

<210> 6

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificiel sequence

<220>

<223> cDNA

<400> 6

CGCGGATCCT CACTGGTTCG GGTAAGACTG CTACTTTCTC T

41

<210> 7

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificiel sequence

<220>

<223> cDNA

<400> 7

CGCGGATCCT CACTGGTTCG GGTAAGACTG CTACTTTCTC T

41

<210> 8

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificiel sequence

<220>

<223> cDNA

<400> 8

ATAAGAATGC GGCCGCGTTC TACCGATTCT GTGGACATAG

40

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 9
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificiel sequence
<220>
<223> cDNA
<400> 9

GTTCTACCAT TCTGTG

16

<210> 10
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificiel sequence
<220>
<223> cDNA
<400> 10

ACGGTTCGGT AAGAC

15

<210> 11
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificiel sequence
<220>
<223> cDNA
<400> 11

ATAGAATTCC CACAGAGAAT GCT

23

<210> 12
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificiel sequence
<220>
<223> cDNA
<400> 12

ATAGGATCCG TTCTACCATT CTGTG

25

<210> 13
<211> 771
<212> DNA
<213> Tetrahymena thermophila
<220>
<223> cDNA

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<400> 13

```

CCCACTAGAG AACTCGCTAT GCAAATCGAA AGAGAGTCCG AAAGATTTGG TAAATCCTCT      60
AAGCTTAAAT GTGCTTGAT CTATGGTGGT GCTGACAAAT ACTCCTAAAG AGCACTTCTC      120
CAATAAGGTG TAGATGTAGT TATTGCTACT CCTGGTAGAC TTATTGACTT TTTAGAAAGT      180
GAAACTACTA CTTTACGTAG AGTTACTTAT CTCGTATTAG ATGAAGCAGA TAGAATGTTA      240
GATATGGGTT TTGAAATTTA AATTAGAAAA ATCTTGGGTT AAATTAGACC TGATCGTTAA      300
ACATTGATGT TTTCTGCTAC CTGGCCTAAG AATGTTTAGA ATCTTGCTTA AGATTATTGC      360
AAGAATACTC CCGTTTATGT TCAAATCGGA AAACATGAAT TAGCTATTAA CGAAAGAATT      420
AAATAAATTG TTTATGTTAC AGATCAATCA AAGAAAATCA ATCAACTTAT CAAGCAATTA      480
GATTGTTTGA CTTAGAAAGA TAAAGTATTG ATTTTCGCTT AAACAAAGAA GGGATGTGAA      540
AGCATGAGTC GTATTTTGAA TAAAGAAGGA TTTAAGTGTC TTGCTATCCA TGGTGACAAA      600
GCCTAAAAAG ACAGAGACTA TGTTATGAAC AAGTTCAAAA GCGGAGAATG CAGAATCCTT      660
ATTGCTACAG ACGTAGCCAG TAGAGGTTTG GATGTTAAGG ATGTCTCCCA CGTATTTAAT      720
TACGATTTCC CAAAGGTTAT GGAAGACTAT GTCCACAGAA TCGGTAGAAC G              771

```

```

<210> 14
<211> 257
<212> Protein
<213> Tetrahymena thermophila
<220>
<223> PRT
<400> 14

```

```

Pro Thr Arg Glu Leu Ala Met Gln Ile Glu Arg Glu Ser Glu Arg Phe
1              5              10              15
Gly Lys Ser Ser Lys Leu Lys Cys Ala Cys Ile Tyr Gly Gly Ala Asp
20              25              30
Lys Tyr Ser Gln Arg Ala Leu Leu Gln Gln Gly Val Asp Val Val Ile
35              40              45
Ala Thr Pro Gly Arg Leu Ile Asp Phe Leu Glu Ser Glu Thr Thr Thr
50              55              60
Leu Arg Arg Val Thr Tyr Leu Val Leu Asp Glu Ala Asp Arg Met Leu
65              70              75              80
Asp Met Gly Phe Glu Ile Gln Ile Arg Lys Ile Leu Gly Gln Ile Arg
85              90              95
Pro Asp Arg Gln Thr Leu Met Phe Ser Ala Thr Trp Pro Lys Asn Val
100             105             110

```

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Gln Asn Leu Ala Gln Asp Tyr Cys Lys Asn Thr Pro Val Tyr Val Gln
 115 120 125

Ile Gly Lys His Glu Leu Ala Ile Asn Glu Arg Ile Lys Gln Ile Val
 130 135 140

Tyr Val Thr Asp Gln Ser Lys Lys Ile Asn Gln Leu Ile Lys Gln Leu
 145 150 155 160

Asp Cys Leu Thr Gln Lys Asp Lys Val Leu Ile Phe Ala Gln Thr Lys
 165 170 175

Lys Gly Cys Glu Ser Met Ser Arg Ile Leu Asn Lys Glu Gly Phe Lys
 180 185 190

Cys Leu Ala Ile His Gly Asp Lys Ala Gln Lys Asp Arg Asp Tyr Val
 195 200 205

Met Asn Lys Phe Lys Ser Gly Glu Cys Arg Ile Leu Ile Ala Thr Asp
 210 215 220

Val Ala Ser Arg Gly Leu Asp Val Lys Asp Val Ser His Val Phe Asn
 225 230 235 240

Tyr Asp Phe Pro Lys Val Met Glu Asp Tyr Val His Arg Ile Gly Arg
 245 250 255

Thr

<210> 15
 <211> 765
 <212> DNA
 <213> Tetrahymena thermophila
 <220>
 <223> cDNA
 <400> 15

CCCACCAGAG AATTAGCCCA ATAACTATC ACCGTTATTA TGTACTTAGG TGAATTCTTG 60

AAGGTCTCCG CCTATGCTTG CACTGGTGGT ACTGATCCCA AGGAAGATAG AAAGAGATTA 120

AGAGAAGGTG TCCAAGTCGT TGTGGTACC CCTGGTAGAG TTTTGGATTT AATCTAAAAG 180

AAGACTTTAG TCACCGATCA CTAAAATTA TTCATTTTGG ACGAAGCCGA TGAAATGTTA 240

GGAAGAGGTT TCAAGGATCA AATTAACAAA ATCTTCTAAA ACTTACCCCA CGATATCTAG 300

GTGCTCTTT TCTCTGCTAC CATGGCTCCC GAAATTCTTG AAATTACCAA GTAATTTATG 360

AGAGACCCCG CTACTATCCT TGTCAAGAAT GATGACTTGA CTTTGGACGG TATTAAATAA 420

TTCTACATCG CCTTAGATAA GGAAGAATGG AAGTTTGACA CCTTAGTCGA ATTATACAAT 480

AACATCGAAA TCGCTTAAGC TATTATCTAT TGCAACACCA AGAAGAGAGT CGATGAATTA 540

AGAGACAAGC TTATTGAAAA GAATATGACC GTCTCTGCTA TGCACGGTGA AATGGACCAA 600

TAAACAGAG ATCTTATTAT GAAGGAATTC AGAACCGGTA CCTCCAGAGT TCTTATCACT 660

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ACTGATTTGC TCTCCAGAGG TATTGATATC CATCAAGTCA ACTTGGTTAT CAACTACGAC 720
 TTACCCCTTA AGAAGGAATG TTATATTCAC AGAATCGGTA GAACA 765

<210> 16
 <211> 255
 <212> Protein
 <213> Tetrahymena thermophila
 <220>
 <223> PRT
 <400> 16

Pro Thr Arg Glu Leu Ala Gln Gln Thr Ile Thr Val Ile Met Tyr Leu
 1 5 10 15
 Gly Glu Phe Leu Lys Val Ser Ala Tyr Ala Cys Thr Gly Gly Thr Asp
 20 25 30
 Pro Lys Glu Asp Arg Lys Arg Leu Arg Glu Gly Val Gln Val Val Val
 35 40 45
 Gly Thr Pro Gly Arg Val Leu Asp Leu Ile Gln Lys Lys Thr Leu Val
 50 55 60
 Thr Asp His Leu Lys Leu Phe Ile Leu Asp Glu Ala Asp Glu Met Leu
 65 70 75 80
 Gly Arg Gly Phe Lys Asp Gln Ile Asn Lys Ile Phe Gln Asn Leu Pro
 85 90 95
 His Asp Ile Gln Val Ala Leu Phe Ser Ala Thr Met Ala Pro Glu Ile
 100 105 110
 Leu Glu Ile Thr Lys Gln Phe Met Arg Asp Pro Ala Thr Ile Leu Val
 115 120 125
 Lys Asn Asp Asp Leu Thr Leu Asp Gly Ile Lys Gln Phe Tyr Ile Ala
 130 135 140
 Leu Asp Lys Glu Glu Trp Lys Phe Asp Thr Leu Val Glu Leu Tyr Asn
 145 150 155 160
 Asn Ile Glu Ile Ala Gln Ala Ile Ile Tyr Cys Asn Thr Lys Lys Arg
 165 170 175
 Val Asp Glu Leu Arg Asp Lys Leu Ile Glu Lys Asn Met Thr Val Ser
 180 185 190
 Ala Met His Gly Glu Met Asp Gln Gln Asn Arg Asp Leu Ile Met Lys
 195 200 205
 Glu Phe Arg Thr Gly Thr Ser Arg Val Leu Ile Thr Thr Asp Leu Leu
 210 215 220
 Ser Gly Gly Ile Asp Ile His Gln Val Asn Leu Val Ile Asn Tyr Asp
 225 230 235 240
 Leu Pro Leu Lys Lys Glu Cys Tyr Ile His Arg Ile Gly Arg Thr
 245 250 255

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/04892

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/61 C12N15/82 C12N9/90 C07K16/40 C12Q1/68
A61K31/713 A61K38/52 G01N33/573

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K C12Q A61K G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	"Schizosaccharomyces pombe p68 protein; p68 gene; RNA helicase" EMBL SEQUENCE DATABASE, 19. April 1991 (1991-04-19), XP002121699 Cambridge, UK Accession nos. Emfun.X52648; Pir2:S14048 & R.D. IGGO ET AL.: "p68 RNA helicase: Identification of a nucleolar form and cloning of related genes containing a conserved intron in yeasts" MOL. CELL. BIOL., Bd. 11, Nr. 3, März 1991 (1991-03), Seiten 1326-1333, ASM WASHINGTON, DC,US --- -/-	1,3,6-9, 11,12



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

5. November 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

17. 11. 99

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hornig, H

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter nales Aktenzeichen
PCT/EP 99/04892

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>"Human DEAD-box protein p72" EMBL SEQUENCE DATABASE, 5. Oktober 1996 (1996-10-05), XP002121700 Cambridge, UK Accession nos.: Emhum4.U59321; Pir2:S72367; & G.M. LAMM ET AL.: "p72: a human nuclear DEAD box protein highly related to p68" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 24, Nr. 19, 1996, Seiten 3739-3747, IRL PRESS LIMITED, OXFORD, ENGLAND das ganze Dokument</p>	1,3,6-9, 11,12
X	<p>--- "A. thaliana mRNA for eucaryotic translation initiaition factor 4A-2" EMBL SEQUENCE DATABASE, 20. November 1992 (1992-11-20), XP002121701 Cambridge, UK Accession nos.: Empln.X65053; Pir2:Jc1453; & A.M. METZ ET AL.: "Sequences for two cDNAs encoding Arabisopsis thaliana eucaryotic protein synthesis initiation factor 4A" GENE, Bd. 120, 1992, Seiten 313-314, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, B.V., AMSTERDAM, NL; das ganze Dokument</p>	2,3,6-8, 10-12
X	<p>--- "N. plumbaginifolia NeIF-4A2 mRNA for nicotiana eucaryotic translation initiation factor 4A" EMBL SEQUENCE DATABASE, 24. Oktober 1991 (1991-10-24), XP002121702 Cambridge, UK Accession nos.: Empln.X61205; Pir2:S22578; & G.W. OWTRIM ET AL.: "Divergent genes for translation initiation factor eIF-4A are coordinately expressed in tobacco" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 19, Nr. 20, 1991, Seiten 5491-5496, IRL PRESS LIMITED, OXFORD, ENGLAND das ganze Dokument</p>	2,3,6-8, 10-12
A	<p>--- Z.J. LORKOVIC ET AL.: "PRH75, a new nucleus-localized member of the DEAD-box protein family from higher plants" MOL. CELL. BIOL., Bd. 17, Nr. 4, April 1997 (1997-04), Seiten 2257-2265, XP002121703 ASM WASHINGTON, DC, US in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-24

-/--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/04892

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	S.P. MARGOSSIAN AND R.A. BUTOW: "RNA turnover and the control of mitochondrial gene expression" TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES, Bd. 21, Nr. 10, Oktober 1996 (1996-10), Seiten 392-396, XP002121704 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL das ganze Dokument ---	1-24
A	DE 195 45 126 A (HOECHST AG) 5. Juni 1997 (1997-06-05) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1-24

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In nationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/04892

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht rechenerkennbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

In soweit sich die Ansprüche 21,22 und 23 auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält.

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle rechenerkennbaren Ansprüche
2. ☐ Da für alle rechenerkennbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/04892

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19545126 A	05-06-1997	AU 7407696 A	12-06-1997
		CA 2191827 A	05-06-1997
		EP 0778347 A	11-06-1997
		JP 9173087 A	08-07-1997
		US 5942429 A	24-08-1999

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No. PCT/EP 99/04892	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/61 C12N15/82 C12N9/90 C07K16/40 C12Q1/68 A61K31/713 A61K38/52 G01N33/573	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K C12Q A61K G01N	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages
X	"Schizosaccharomyces pombe p68 protein; p68 gene; RNA helicase" EMBL SEQUENCE DATABASE, 19 April 1991 (1991-04-19), XP002121699 Cambridge, UK Accession nos. Emfun.X52648; Pir2:S14048 & R.D. IGGO ET AL.: "p68 RNA helicase: Identification of a nucleolar form and cloning of related genes containing a conserved intron in yeasts" MOL. CELL. BIOL., vol. 11, no. 3, March 1991 (1991-03), pages 1326-1333, ASM WASHINGTON, DC,US <div style="text-align: center;">— —</div>
	Relevant to claim No. 1,3,6-9, 11,12
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. </div>	
* Special categories of cited documents : <div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>	
Date of the actual completion of the international search <div style="text-align: center;">5 November 1999</div>	Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center;">17. 11. 99</div>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer <div style="text-align: center;">Hornig, H</div>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No
PCT/EP 99/04892

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>"Human DEAD-box protein p72" EMBL SEQUENCE DATABASE, 5 October 1996 (1996-10-05), XP002121700 Cambridge, UK Accession nos.: Emhum4.U59321; Pir2:S72367; & G.M. LAMM ET AL.: "p72: a human nuclear DEAD box protein highly related to p68" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 24, no. 19, 1996, pages 3739-3747, IRL PRESS LIMITED, OXFORD, ENGLAND the whole document</p>	1,3,6-9, 11,12
X	<p>"A. thaliana mRNA for eucaryotic translation initiation factor 4A-2" EMBL SEQUENCE DATABASE, 20 November 1992 (1992-11-20), XP002121701 Cambridge, UK Accession nos.: Empln.X65053; Pir2:Jc1453; & A.M. METZ ET AL.: "Sequences for two cDNAs encoding Arabisopsis thaliana eucaryotic protein synthesis initiation factor 4A" GENE, vol. 120, 1992, pages 313-314, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, B.V., AMSTERDAM, NL; the whole document</p>	2,3,6-8, 10-12
X	<p>"N. plumbaginifolia NeIF-4A2 mRNA for nicotiana eucaryotic translation initiation factor 4A" EMBL SEQUENCE DATABASE, 24 October 1991 (1991-10-24), XP002121702 Cambridge, UK Accession nos.: Empln.X61205; Pir2:S22578; & G.W. OWTTRIM ET AL.: "Divergent genes for translation initiation factor eIF-4A are coordinately expressed in tobacco" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 19, no. 20, 1991, pages 5491-5496, IRL PRESS LIMITED, OXFORD, ENGLAND the whole document</p>	2,3,6-8, 10-12
A	<p>Z.J. LORKOVIC ET AL.: "PRH75, a new nucleus-localized member of the DEAD-box protein family from higher plants" MOL. CELL. BIOL., vol. 17, no. 4, April 1997 (1997-04), pages 2257-2265, XP002121703 ASM WASHINGTON, DC, US cited in the application the whole document</p>	1-24

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In. International Application No
PCT/EP 99/04892

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	S.P. MARGOSSIAN AND R.A. BUTOW: "RNA turnover and the control of mitochondrial gene expression" TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES, vol. 21, no. 10, October 1996 (1996-10), pages 392-396, XP002121704 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL the whole document	1-24
A	DE 195 45 126 A (HOECHST AG) 5 June 1997 (1997-06-05) cited in the application the whole document	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 99/04892

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

In so far as Claims Nos. 21, 22 and 23 relate to a method for treatment of the human/animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/04892

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19545126 A	05-06-1997	AU 7407696 A	12-06-1997
		CA 2191827 A	05-06-1997
		EP 0778347 A	11-06-1997
		JP 9173087 A	08-07-1997
		US 5942429 A	24-08-1999

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Patent claims

1. A nucleic acid coding for an RNA helicase having an amino acid sequence depicted in SEQ ID No. 13 or a functional variant thereof, and parts thereof having at least 8 nucleotides, SEQ ID No. 13 being part of the claim.
2. A nucleic acid coding for an RNA helicase having an amino acid sequence depicted in SEQ ID No. 15 or a functional variant thereof, and parts thereof having at least 8 nucleotides, SEQ ID No. 15 being part of the claim.
3. A nucleic acid as claimed in claim 1 and 2, wherein the nucleic acid is a DNA or RNA, preferably a double-stranded DNA.
4. A nucleic acid as claimed in claim 1 to 3 and obtainable from ciliates.
5. A nucleic acid as claimed in claim 4 and obtainable from *Tetrahymena thermophila*.
6. A DNA antisense strand and an RNA antisense strand obtainable from nucleic acids as claimed in claim 1 to 5.
7. A nucleic acid as claimed in one of claims 1 to 6, wherein the nucleic acid is included in a vector, preferably in an expression vector or a vector effective for gene therapy.
8. A method for preparing a nucleic acid as claimed in one of claims 1 - 6, wherein the nucleic acid is chemically synthesized or isolated from a gene library using a probe.
9. A polypeptide having an amino acid sequence depicted in SEQ ID No. 14 or a functional variant thereof, and parts thereof having at least 6 amino acids.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REPLACED BY:
ART 34 AMDT

WO 00/05388

29

PCT/EP99/04892

10. A polypeptide having an amino acid sequence depicted in SEQ ID No. 16 or a functional variant thereof, and parts thereof having at least 6 amino acids.
- 5 11. A method for preparing a polypeptide as claimed in claim 9 or 10, which comprises expressing a nucleic acid as claimed in one of claims 1 to 6 in a suitable host cell.
12. An antibody against a polypeptide as claimed in claim 9 or 10.
- 10 13. A method for producing an antibody as claimed in claim 12, which comprises immunizing a mammal with a polypeptide as claimed in claim 9 or 10 and, where appropriate, isolating the generated antibodies.
- 15 14. A pharmaceutical comprising a nucleic acid as claimed in one of claims 1 to 6 or a polypeptide as claimed in claim 9 or 10 and, where appropriate, pharmaceutically acceptable additives and/or excipients.
- 20 15. A process for producing a pharmaceutical for treating cancer, autoimmune diseases, in particular multiple sclerosis or rheumatoid arthritis, Alzheimer's disease, allergies, in particular neurodermatitis, type I allergies or type IV allergies, arthrosis, atherosclerosis,
- 25 osteoporosis, acute and chronic infectious diseases and/or diabetes, and/or for affecting the cell metabolism, in particular in association with immunosuppression, especially in association with transplants and/or genetic diseases, in particular Werner's syndrome, Bloom's syndrome, xeroderma pigmentosa and connective tissue diseases,
- 30 which comprises formulating a nucleic acid as claimed in one of claims 1-6 or a polypeptide as claimed in claim 9 or 10 or an antibody as claimed in claim 12 together with a pharmaceutically acceptable additive and/or excipient.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REPLACED BY
ART 34 AMDT

WO 00/05388

30

PCT/EP99/04892

- 5
16. A diagnostic agent comprising a nucleic acid as claimed in one of claims 1-6 or a polypeptide as claimed in claim 9 or 10 or an antibody as claimed in claim 12 and, where appropriate, suitable additives and/or excipients.
- 10
17. A process for preparing a diagnostic agent for diagnosing cancer, autoimmune diseases, in particular multiple sclerosis or rheumatoid arthritis, Alzheimer's disease, allergies, in particular neurodermatitis, type I allergies or type IV allergies, arthrosis, atherosclerosis, osteoporosis, acute and chronic infectious diseases and/or diabetes, and/or for analyzing the cell metabolism, in particular the immune status, especially in association with transplants, and/or for analyzing genetic diseases, in particular Werner's syndrome, Bloom's syndrome, xeroderma pigmentosa and connective tissue
- 15
18. diseases, which comprises adding a pharmaceutically acceptable carrier to a nucleic acid as claimed in one of claims 1-6 or a polypeptide as claimed in claim 9 or 10 or an antibody as claimed in claim 12.
- 20
18. An assay for identifying functional interactors, which comprises a nucleic acid as claimed in one of claims 1-6 or a polypeptide as claimed in claim 9 or 10 or an antibody as claimed in claim 12 and, where appropriate, suitable additives and/or excipients.
- 25
19. The use of a nucleic acid as claimed in one of claims 1-6 or of a polypeptide as claimed in claim 9 or 10 for identifying functional interactors.
- 30
20. The use of a nucleic acid as claimed in one of claims 1-6 for detecting variants of RNA helicase, which comprises screening a gene library using said nucleic acid and isolating the variant found.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REPLACED BY
ART 34 AMDT

WO 00/05388

31

PCT/EP99/04892

21. The use of the nucleic acids as claimed in one of claims 1-6 or of a polypeptide as claimed in claim 9 or 10 for affecting protein biosynthesis.
- 5 22. The use of the nucleic acids and polypeptides as claimed in claim 21 for inhibiting mRNA degradation and/or stimulating mRNA degradation and/or stabilizing mRNA.
- 10 23. The use of the nucleic acids and polypeptides as claimed in claim 21 for heterologous expression in useful plants.
24. The use of the nucleic acids as claimed in one of claims 1-6 or of a polypeptide as claimed in claim 9 or 10 as selection markers in molecular biology.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Patent claims

ART 34 AND

- 5 1. A nucleic acid coding for an RNA helicase having an amino acid sequence depicted in SEQ ID No. 14 or functional variants thereof, and parts thereof having at least 20 nucleotides, SEQ ID No. 13 being part of the claim and functional variants being proteins having a sequence homology of at least 70% or proteins having deletions of up to 60 amino acids or fusion proteins which comprise the amino acid sequence of SEQ ID No. 14.
- 10 2. A nucleic acid coding for an RNA helicase having an amino acid sequence depicted in SEQ ID No. 16 or functional variants thereof, and parts thereof having at least 20 nucleotides, SEQ ID No. 15 being part of the claim and functional variants being proteins having a sequence homology of at least 70% or proteins having deletions of up to 60 amino acids or fusion proteins which comprise the amino acid sequence of SEQ ID No. 16.
- 15 3. A nucleic acid as claimed in claim 1 and 2, wherein the nucleic acid is a DNA or RNA, preferably a double-stranded DNA.
- 20 4. A nucleic acid as claimed in claim 1 to 3 and obtainable from ciliates.
- 25 5. A nucleic acid as claimed in claim 4 and obtainable from *Tetrahymena thermophila*.
- 30 6. A DNA antisense strand and an RNA antisense strand obtainable from nucleic acids as claimed in claim 1 to 5.
- 35 7. A nucleic acid as claimed in one of claims 1 to 6, wherein the nucleic acid is included in a vector, preferably in an expression vector or a vector effective for gene therapy.
8. A method for preparing a nucleic acid as claimed in one of claims 1 - 6, wherein the nucleic acid is chemically synthesized or isolated from a gene library using a probe.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Abstract

Novel genes of the DEAD box protein family, their expression products and use

5

The present invention relates to the preparation of two novel nucleic acids – Hc1 and Hc2 – which are homologous to known DEAD box proteins, which correspond to RNA helicases, and which can be obtained from ciliates.

10

The invention also relates to the insertion of the novel nucleic acids into suitable target cells using recombinant DNA technologies, and to the use thereof for regulating transcription and translation.

15 In addition, the invention relates to the in-vitro or in-vivo transcription of the novel nucleic acids for producing novel proteins and to the use thereof in treatment and diagnosis.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

6
M.H

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 1998/F083 NP	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 99/04892	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 10/07/1999
(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 22/07/1998	
Anmelder AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES GMBH & CO KG	

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 5 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☒ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☐ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☒ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

GENE DER DEAD BOX PROTEINFAMILIE, DEREN EXPRESSIONSPRODUKTE UND VERWENDUNG

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 3

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ keine der Abb.

☒ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Patent No.	107
Vorg.	
Dtg.	08. Juni 2000
Ort	
Verf.	

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES
GMBH & CO. KG
Patent- und Lizenzabteilung
Industriepark Höchst
Gebäude D 706
D-65926 Frankfurt am Main
ALLEMAGNE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

Date of mailing (day/month/year) 25 May 2000 (25.05.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 1998/FO83 NP	
International application No. PCT/EP99/04892	International filing date (day/month/year) 10 July 1999 (10.07.99)

1. The following indications appeared on record concerning:

☐ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES
GMBH & CO. KG
Patent- und Lizenzabteilung
Industriepark Höchst
Gebäude K 801
D-65926 Frankfurt am Main
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

069-305-4305

Facsimile No.

069-305-16350

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES
GMBH & CO. KG
Patent- und Lizenzabteilung
Industriepark Höchst
Gebäude D 706
D-65926 Frankfurt am Main
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

069-305-4303

Facsimile No.

069-305-16350

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

Please note new address for correspondence.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority ☒ the elected Offices concerned
☒ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

A. Karkachi

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

Techn. Sachb. erl. Ka

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:
AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES
GMBH & CO. KG
Patent- und Lizenzabteilung
Industriepark Höchst, Gebäude K 801
D-65926-Frankfurt am Main
ALLEMAGNE

SD

1. FEB. 2000

11.02.00

CS

Date of mailing (day/month/year) 03 February 2000 (03.02.00)		
Applicant's or agent's file reference 1998/FO83 NP		
International application No. PCT/EP99/04892	International filing date (day/month/year) 10 July 1999 (10.07.99)	Priority date (day/month/year) 22 July 1998 (22.07.98)
Applicant AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES GMBH & CO. KG et al		

IMPORTANT NOTICE

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
AU,EP,JP,KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
CA,IN

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on
03 February 2000 (03.02.00) under No. WO 00/05388

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

09/743494
5640
Translation

540
PATENT COOPERATION TREATY
PCT
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 1998/FO83 NP	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP99/04892	International filing date (day/month/year) 10 July 1999 (10.07.99)	Priority date (day/month/year) 22 July 1998 (22.07.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/61		
Applicant AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES GMBH & CO. KG		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.	
2. This REPORT consists of a total of <u>10</u> sheets, including this cover sheet.	
<input checked="" type="checkbox"/>	This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
These annexes consist of a total of <u>5</u> sheets.	
3. This report contains indications relating to the following items:	
I <input checked="" type="checkbox"/>	Basis of the report
II <input type="checkbox"/>	Priority
III <input type="checkbox"/>	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
IV <input checked="" type="checkbox"/>	Lack of unity of invention
V <input checked="" type="checkbox"/>	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
VI <input type="checkbox"/>	Certain documents cited
VII <input type="checkbox"/>	Certain defects in the international application
VIII <input checked="" type="checkbox"/>	Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 11 January 2000 (11.01.00)	Date of completion of this report 06 October 2000 (06.10.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/04892

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☒ the international application as originally filed.
- ☐ the description, pages 1-27, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☐ the claims, Nos. _____, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. 2, filed with the letter of 07 June 2000 (07.06.2000),
 Nos. 1,3-24, filed with the letter of 17 August 2000 (17.08.2000).
- ☐ the drawings, sheets/fig 1/5-5/5, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 99/04892

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	7-24	YES
	Claims	1-6	NO
Inventive step (IS)	Claims	9-13	YES
	Claims	7-8, 14-24	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-20, 23-24	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

See supplemental box

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 99/04892

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

See supplemental box

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: Boxes I, IV.3, V.2 & VIII

The present application describes two new proteins, Hc1 and Hc2, which belong the group of DEAD-box proteins, nucleic acids that code for these proteins and possible applications of these proteins and nucleic acids.

Consequently, the designation "Hc1" relates to the protein with an amino acid sequence as per SEQ ID 14 or to a nucleic acid sequence as per SEQ ID 13. Similarly, the designation "Hc2" relates to a protein as per amino and nucleic acid sequences SEQ ID 16 and SEQ ID 15, respectively.

Re. Box I**Basis of the report**

The amended claims filed on the 19 August 2000 (with the letter dated 17 August 2000) were taken as the basis for this examination report.

However, **Claim 2** was not acknowledged to be valid, since it claims "nucleic acids...and parts thereof with at least 25 nucleotides...". (However, the description of the amended claims in the covering letter refers to "22 nucleotides").

Nevertheless, this lacks foundation in the description, since the passage of text from the description cited in the covering letter (page 6, line 15) describes "a nucleic acid comprising at least approximately 20 nucleotides".

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternational application No.
PCT/EP 99/04892**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: Boxes I, IV.3, V.2 & VIII

Consequently, the Claim 2 submitted with the letter of 19 August 2000 is not valid under PCT Article 41(2).

Consequently, the version of Claim 2 submitted on 9 June 2000 was used as basis for this examination report.

Re. Box IV**Lack of unity of invention**

Although Hc1 and Hc2 belong to the group of DEAD-box proteins, sequence comparisons with other proteins from this group show a relationship between Hc1 and the sub-group of p68 and p72 proteins (D1, D2), whereas Hc2 appears to be more closely related to the eIF-4A proteins of different species.

Although, as specified under point V.6, the isolation from *Tetrahymena* contributes to the acknowledgement of an inventive step for both individual genes claimed in the present application, this fact is not a sufficient basis for combining the genes and the proteins Hc1 and Hc2 to produce an invention that meets the requirements of unity of invention, since no special technical feature (PCT Rule 13.2) can be seen in the isolation of different genes from *Tetrahymena*.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: Boxes I, IV.3, V.2 & VIII

Nor can the combination "RNA helicase from *Tetrahymena*" be considered a special technical feature, since the two genes belong to very different sub-groups of RNA helicases. Moreover, a number of different RNA helicases were already isolated from different organisms and clearly no novel technical effect is achieved with the feature whereby they are prepared from *Tetrahymena*.

Consequently, no common special technical feature pursuant to PCT Rule 13.2 is present and unity of invention is not established.

The present application therefore comprises the following two inventions:

- 1) gene and protein as per SEQ ID 13 and 14;
- 2) gene and protein as per SEQ ID 15 and 16.

Re. Box V

The application does not meet the requirements of PCT Article 33, since **Claims 1-6 are not novel** and **Claims 7-8 and 14-24 do not involve an inventive step**.

- 1) Hereinafter reference is made to the following documents (the sequence of the documents corresponds to the sequence in which they are listed in the international search report):

D1: 'Schizosaccharomyces pombe p68 protein; p68

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 99/04892**Supplemental Box**
(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: Boxes I, IV.3, V.2 & VIII

gene; RNA helicase' EMBL SEQUENCE DATABASE,
19 April 1991 (1991-04-19), XP002121699
Cambridge, UK & R.D. IGGO ET AL.: 'p68 RNA
helicase: Identification of a nucleolar form
and cloning of related genes containing a
conserved intron in yeasts' MOL. CELL. BIOL.,
Vol. 11, No. 3, March 1991 (1991-03), pages
1326-1333, ASM WASHINGTON DC, US

D2: 'Human DEAD-box protein p72' EMBL SEQUENCE
DATABASE, 5 October 1996 (1996-10-05),
XP002121700 Cambridge, UK & G.M. LAMM ET AL.:
'p72: a human nuclear DEAD box protein highly
related to p68' NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Vol.
24, No. 19, 1996, pages 3739-3747, IRL PRESS
LIMITED, OXFORD, ENGLAND

D3: 'A. thaliana mRNA for eucaryotic translation
initiation factor 4A-2' EMBL SEQUENCE DATABASE,
20 November 1992 (1992-11-20), XP002121701
Cambridge, UK & A.M. METZ ET AL.: 'Sequences
for two cDNAs encoding Arabisopsis thaliana
eucaryotic protein synthesis initiation factor
4A' GENE, Vol. 120, 1992, pages 313-314,
ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, B.V., AMSTERDAM,
NL;

D4: 'N. plumbaginifolia NelF-4A2 mRNA for nicotiana
eucaryotic translation initiation factor 4A'
EMBL SEQUENCE DATABASE, 24 October 1991
(1991-10-24), XP002121702 Cambridge, UK & G.W.
OWTTRIM ET AL.: 'Divergent genes for
translation initiation factor eIF-4A are
coordinately expressed in tobacco' NUCLEIC

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: Boxes I, IV.3, V.2 & VIII

ACIDS RESEARCH, Vol. 19, No. 20, 1991, pages
5491-5496, IRL PRESS LIMITED, OXFORD, ENGLAND
D8: "Saccharomyces cerevisiae TIF2 gene". EMBL
SEQUENCE DATABASE, 17 Nov. 1988 (update 12 Nov.
1993) Accession No. X12814.

Novelty (PCT Article 33(2))

- 2) **Claim 1** relates to "nucleic acids that code for a
RNA helicase with an amino acid sequence as per SEQ
ID 14 and parts thereof with at least 20
nucleotides [...]".

Whilst parts of SEQ ID 13, of at least 20
nucleotides long, were not shown in the prior art,
it must be noted that origin cannot be technically
established on the basis of a nucleic acid fragment
(definition of a product in terms of the method for
its production).

Consequently, a nucleic acid as per the above
wording is identical to "parts of a nucleic acid
with at least 20 nucleotides coding for a *fragment*
of an amino acid sequence as per SEQ ID 14".

As also explained in point V.5, parts of SEQ ID 14
of 21 amino acids in length are identical to
already published sequences (D1). Consequently,
nucleic acids of 63 nucleotides in length coding
for a fragment of an amino acid sequence as per SEQ
ID 14 have already been published.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: Boxes I, IV.3, V.2 & VIII

Claim 1 is therefore not considered novel.

- 3) As specified in Box VIII, the scope of protection of Claim 2 also extends to parts of nucleic acids that code for fusion proteins and therefore also to nucleic acids that are wholly unrelated to the present invention. Claim 2 therefore also covers parts of any nucleic acid with at least 20 nucleotides, which is not considered novel.

- 4) Furthermore, the scope of protection of Claim 2 extends to the nucleotide sequence as per SEQ ID 13 and parts thereof with at least 20 nucleotides. Although the nucleotide sequences described in D3 and D4 are 60 and 63.4% identical to SEQ ID 15, as well as related identical nucleotide sequences of 14 and 18 bp, document D8, which describes the *Saccharomyces cerevisiae* TIF2 gene, shows a related identical nucleotide sequence of 21 bp.

This also falls within the scope of protection of Claim 2. For these reasons, Claim 2 cannot be considered novel.

- 5) By publishing the nucleic acid sequences as per Claims 1 and 2, the technical features of Claims 3 and 6 are already implicitly covered. Claims 3 and 6 are therefore not novel.

- 6) As also stated in point V.2, the origin of an isolated nucleic acid sequence cannot be derived

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Supplemental Box
(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: Boxes I, IV.3, V.2 & VIII

from the sequence itself. The technical feature relating to the origin of an already known nucleic acid from an alternative organism does not, therefore, represent a distinguishing feature.

Consequently, Claims 4 and 5 are not novel.

7) Although Claims 7 and 8 represent standard methods, they are not described as such in the prior art and can be considered novel.

8) Documents D1 and D2 describe proteins of an amino acid sequence that are, respectively, 59.2 and 56.8% identical to SEQ ID 14 and related identical sequences of 21 and 17 amino acids, respectively.

Claim 9 can therefore be considered novel.

9) The same applies to Claim 10, since the proteins of documents D3 and D4 are, respectively, 59.2 and 61.2% identical to SEQ ID 16 and have related identical sequences of 10 amino acids.

10) Since Claim 11 refers to the novel Claims 9 and 10, a method as per Claim 11 can also be considered novel.

11) Antibodies and the production thereof as per Claims 12 and 13, respectively, can also be considered novel. Although it is probable that antibodies directed against numerous already known

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 99/04892

Supplemental Box
(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: Boxes I, IV.3, V.2 & VIII

p68, p72 and eIF-4A proteins also react with the present proteins, this cannot be clearly shown at the present time.

- 12) The subjects or methods as per Claims 14-24 are also based on nucleic acids of Claims 1-6, which do not satisfy the requirement for novelty.

Nevertheless, the prior art does not explicitly show such subjects or methods. Claims 14-24 are therefore considered novel.

Inventive step (PCT Article 33(3))

- 13) The production of an expression vector as per Claim 7 and a method for the production of a nucleic acid as per Claim 8 are standard methods. With regard to the use or production of sequences that do not satisfy the requirement for novelty, no inventive step can be acknowledged.
- 14) The methods for cloning the claimed genes Hc1 and Hc2 are standard methods that do not involve an inventive step, since the PCR primers used for isolation purposes represent only degenerated sequences of the already described p68/p72 or eIF-4A genes. The technical problem of interest therefore consists merely in preparing an alternative organism for isolating corresponding genes.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Supplemental Box
(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: Boxes I, IV.3, V.2 & VIII

Tetrahymena is a commonly used model organism in this field. Although the cloning of corresponding proteins from *Tetrahymena* is obvious to a person skilled in the art, none of the prior art documents expressly refers to the genus *Tetrahymena* or to the group of ciliates. The proteins of Claims 9 and 10 and a method for the production thereof as per Claim 11 could therefore be considered inventive.

- 15) Accordingly, an inventive step can also be acknowledged for the preparation of antibodies and a method for the production thereof, as per Claims 12 and 13, respectively.
- 16) Whilst the subjects and methods of Claims 14-24 can be considered novel, no inventive step can be acknowledged. Said claims also relate to possible uses of nucleic acids of Claims 1-6, which do not satisfy the requirement for novelty. These uses are already known for similar genes, proteins, or fragments of these genes or proteins (as also stated in the actual application, for example page 2, line 22 - page 4, line 6) or represent standard uses.

Moreover, since the applicant is not able to demonstrate any technical effect produced by the use of the nucleic acids or peptides as per the present claims in contrast to already known uses of similar genes or proteins, Claims 14-24 do not involve an inventive step.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: Boxes I, IV.3, V.2 & VIII

Industrial applicability

- 17) The subject matter of Claims 21 and 22 also covers its application for medical treatment. The PCT Contracting States do not have uniform criteria for assessing the industrial applicability of these claims. Patentability can also depend on the wording of the claims. The EPO, for example, does not recognise industrial applicability of claims to the use of a compound in a medical treatment; it does, however, allow claims to the first use of a known compound in a medical treatment or to the use of such a compound in the manufacture of a drug for a new medical treatment (see PCT Rule 67.1(iv)).

According to the wording of Claim 2, the scope of protection of that claim also extends to parts with at least 20 nucleotides of a nucleic acid "that codes for an RNA helicase [...] or *functional variants thereof*". This could not, however, be examined, since, in line with the definition of "functional variants" (page 12, line 19 - page 13, line 11), such a variant could, for example, also be a fusion protein containing SEQ ID 16 or a protein that is approximately 70% identical to SEQ ID 16. Part of a nucleic acid that codes for such a fusion protein can therefore also be from this region, which codes for the fusion partner, and therefore completely different from SEQ ID 15, for example. This cannot be considered novel.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

national application No.
PCT/EP 99/04892

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: Boxes I, IV.3, V.2 & VIII

The same applies to parts of a nucleic acid which code, for example, for a protein that is 70% identical to SEQ ID 14; it would not be possible to examine such a claim given the large number of possibilities.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmeldeamt auszufüllen

Internationales Aktenzeichen **PCT/EP 99/04892**

Internationales Anmeldedatum **(10.07.1999) 10 JUL 1999**

EUROPEAN PATENT OFFICE
PCT INTERNATIONAL APPLICATION
Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)
(max. 12 Zeichen) **1998/F083 NP**

Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG

Neue Gene der DEAD Box Protein-Familie, deren Expressionsprodukte und Verwendung

Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Aventis Research & Technologies GmbH & Co KG

D-65926 Frankfurt am Main
Deutschland

☐ Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Telefonnr.: 069-305-4305

Telefaxnr.: 069-305-16350

Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat): DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: ☐ alle Bestimmungsstaaten ☒ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

BOHNET, Karin
Am Wehr 5
65835 Liederbach
Deutschland

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat): DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: ☐ alle Bestimmungsstaaten ☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☒ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ODER ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als: ☐ Anwalt ☐ gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

Aventis Research & Technologies GmbH & Co KG
Patent- und Lizenzabteilung
Industriepark Höchst, Gebäude K 801
D-65926 Frankfurt am Main

Telefonnr.: 069-305-4305

Telefaxnr.: 069-305-16350

Fernschreibnr.:

☒ Zustellanschrift: Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Wird keines der folgenden Felder benutzt, so sollte dieses Blatt dem Antrag nicht beigelegt werden.

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

HÜLS, Christoph
Rheinblick 19
55263 Wackernheim
Deutschland

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat): DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

MÜLLNER, Stefan
Hagebuttenweg 21
40764 Langenfeld
Deutschland

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat): DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☐ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☐ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☐ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

Regionales Patent


- ☐ AP ARIPO-Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swasiland, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- ☐ EA Eurasisches Patent: AM Armenien, AZ Aserbaidshon, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ EP Europäisches Patent: AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, CY Zypern, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☐ OA OAPI-Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben)

Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> AL Albanien | <input type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input type="checkbox"/> AM Armenien | <input type="checkbox"/> LT Litauen |
| <input type="checkbox"/> AT Österreich | <input type="checkbox"/> LU Luxemburg |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australien | <input type="checkbox"/> LV Lettland |
| <input type="checkbox"/> AZ Aserbaidshon | <input type="checkbox"/> MD Republik Moldau |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina | <input type="checkbox"/> MG Madagaskar |
| <input type="checkbox"/> BB Barbados | <input type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgarien | <input type="checkbox"/> MN Mongolei |
| <input type="checkbox"/> BR Brasilien | <input type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input type="checkbox"/> BY Belarus | <input type="checkbox"/> MX Mexiko |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Kanada | <input type="checkbox"/> NO Norwegen |
| <input type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein | <input type="checkbox"/> NZ Neuseeland |
| <input type="checkbox"/> CN China | <input type="checkbox"/> PL Polen |
| <input type="checkbox"/> CU Kuba | <input type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik | <input type="checkbox"/> RO Rumänien |
| <input type="checkbox"/> DE Deutschland | <input type="checkbox"/> RU Russische Föderation |
| <input type="checkbox"/> DK Dänemark | <input type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input type="checkbox"/> EE Estland | <input type="checkbox"/> SE Schweden |
| <input type="checkbox"/> ES Spanien | <input type="checkbox"/> SG Singapur |
| <input type="checkbox"/> FI Finnland | <input type="checkbox"/> SI Slowenien |
| <input type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich | <input type="checkbox"/> SK Slowakei |
| <input type="checkbox"/> GD Grenada | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input type="checkbox"/> GE Georgien | <input type="checkbox"/> TJ Tadschikistan |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana | <input type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input type="checkbox"/> GM Gambia | <input type="checkbox"/> TR Türkei |
| <input type="checkbox"/> HR Kroatien | <input type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago |
| <input type="checkbox"/> HU Ungarn | <input type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input type="checkbox"/> ID Indonesien | <input type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika |
| <input checked="" type="checkbox"/> IN Indien | |
| <input type="checkbox"/> IS Island | <input type="checkbox"/> UZ Usbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input type="checkbox"/> VN Vietnam |
| <input type="checkbox"/> KE Kenia | <input type="checkbox"/> YU Jugoslawien |
| <input type="checkbox"/> KG Kirgisistan | <input type="checkbox"/> ZW Simbabwe |
| <input type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR Republik Korea | Kästchen für die Bestimmung von Staaten (für die Zwecke eines nationalen Patents), die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind: |
| <input type="checkbox"/> KZ Kasachstan | <input type="checkbox"/> AE Vereinigte arabische Emirate |
| <input type="checkbox"/> LC Saint Lucia | <input type="checkbox"/> ZA Südafrika |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |
| <input type="checkbox"/> LR Liberia | |

Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen: Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der im Zusatzfeld genannten Bestimmungen, die in dieser Erklärung ausgenommen sind. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung einer Bestimmung erfolgt durch die Einreichung einer Mitteilung, in der diese Bestimmung angegeben wird, und die Zahlung der Bestimmungs- und der Bestätigungsgebühr. Die Bestätigung muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSPRUCH <input type="checkbox"/> Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben.				
Anmeldedatum der früheren Anmeldung (Tag/Monat)	Aktenzeichen der früheren Anmeldung	Ist die frühere Anmeldung eine:		
		national Anmeldung: Staat	regionale Anmeldung: regionales Amt	internationale Anmeldung: Anmeldeamt
Zeile (1) 22. Juli 1998 (22.07.98)	19832783.8	DE		
Zeile (2)				
Zeile (3)				
<input type="checkbox"/> Das Anmeldeamt wird ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in der (den) Zeile(n) _____ bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem internationalen Büro zu übermitteln (nur falls die frühere Anmeldung(en) bei dem Amt eingereicht worden ist(sind), das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist) <i>* Falls es sich bei der früheren Anmeldung um eine ARIPO-Anmeldung handelt, so muß in dem Zusatzfeld mindestens ein Staat angegeben werden, der Mitgliedstaat der Pariser Verbandsübereinkunft zum Schutz des gewerblichen Eigentums ist und für den die frühere Anmeldung eingereicht wurde.</i>				
Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE				
Wahl der internationalen Recherchenbehörde (ISA) (falls zwei oder mehr als zwei internationale Recherchenbehörden für die Ausführung der internationalen Recherche zuständig sind, geben Sie die von Ihnen gewählte Behörde an; der Zweibuchstaben-Code kann benutzt werden)		Antrag auf Nutzung der Ergebnisse einer früheren Recherche; Bezugnahme auf diese frühere Recherche (falls eine frühere Recherche bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist):		
ISA /		Datum (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen	Staat (oder regionales Amt)
Feld Nr. VIII KONTROLLISTE; EINREICHUNGSSPRACHE				
Diese internationale Anmeldung enthält die folgende Anzahl von Blättern:		Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:		
Antrag	: 7	1. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung		
Beschreibung (ohne Sequenzprotokollteil)	: 27	2. <input type="checkbox"/> Gesonderte unterzeichnete Vollmacht		
Ansprüche	: 4	3. <input checked="" type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht; Aktenzeichen (falls vorhanden):		
Zusammenfassung	: 1	4. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen einer Unterschrift		
Zeichnungen	: 5	5. <input checked="" type="checkbox"/> Prioritätsbeleg(e), in Feld Nr. VI durch folgende Zeilennummer gekennzeichnet:		
Sequenzprotokollteil der Beschreibung	: 6	6. <input type="checkbox"/> Übersetzung der internationalen Anmeldung in die folgende Sprache:		
Blattzahl insgesamt	: 50	7. <input type="checkbox"/> Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen oder anderem biologischen Material		
Abbildung der Zeichnungen, die mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden soll (Nr.):		8. <input checked="" type="checkbox"/> Sequenzprotokolle für Nucleotide und/oder Aminosäuren in computerlesbarer Form		
		9. <input checked="" type="checkbox"/> Sonstige (einzeln auflisten): (Erklärung zum Sequenzprotokoll)		
		Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht wird: DE		
Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS				
Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.				
 Claus Simandi (AV-Nr. 37986)				

Vom Anmeldeamt auszufüllen	
1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung: (10. 07. 1999) 10 JUL 1999	2. Zeichnungen <input checked="" type="checkbox"/> eingegangen: <input type="checkbox"/> nicht eingegangen:
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:	
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:	
5. Internationale Recherchenbehörde (falls zwei oder mehr zuständig sind): ISA /	6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben

Vom Internationalen Büro auszufüllen
Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Zusatzfeld Wird dieses Zusatzfeld nicht benutzt, so sollte dieses Blatt dem Antrag nicht beigelegt werden.

1. Wenn der Platz in einem Feld nicht für alle Angaben ausreicht: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. ..." [Nummer des Feldes angeben] und machen die Angaben entsprechend der in dem Feld, in dem der Platz nicht ausreicht, vorgeschriebenen Art und Weise, insbesondere:

- (i) Wenn mehr als zwei Anmelder und/oder Erfinder vorhanden sind und kein "Fortsetzungsblatt" zur Verfügung steht: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. III" und machen für jede weitere Person die in Feld Nr. III vorgeschriebenen Angaben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.
- (ii) Wenn in Feld Nr. II oder III die Angabe "die im Zusatzfeld angegebenen Staaten" angekreuzt ist: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. II", "Fortsetzung von Feld Nr. III" bzw. "Fortsetzung von Feld Nr. II und Nr. III" und geben den Namen des Anmelders oder die Namen der Anmelder an und neben jedem Namen den Staat oder die Staaten (und/oder ggf. ARIPO-, eurasisches, europäisches oder OAPI-Patent), für die die bezeichnete Person Anmelder ist.
- (iii) Wenn der in Feld Nr. II oder III genannte Erfinder oder Erfinder/Anmelder nicht für alle Bestimmungsstaaten oder für die Vereinigten Staaten von Amerika als Erfinder benannt ist: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. II", "Fortsetzung von Feld Nr. III" bzw. "Fortsetzung von Feld Nr. II und Nr. III" und geben den Namen des Erfinders oder die Namen der Erfinder an und neben jedem Namen den Staat oder die Staaten (und/oder ggf. ARIPO-, eurasisches, europäisches oder OAPI-Patent), für die die bezeichnete Person Erfinder ist.
- (iv) Wenn zusätzlich zu dem Anwalt oder den Anwälten, die in Feld Nr. IV angegeben sind, weitere Anwälte bestellt sind: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. IV" und machen für jeden weiteren Anwalt die entsprechenden, in Feld Nr. IV vorgeschriebenen Angaben.
- (v) Wenn in Feld Nr. V bei einem Staat (oder bei OAPI) die Angabe "Zusatzpatent" oder "Zusatzzertifikat," oder wenn in Feld Nr. V bei den Vereinigten Staaten von Amerika die Angabe "Fortsetzung" oder "Teilfortsetzung" hinzugefügt wird: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. V" und geben den Namen des betreffenden Staats (oder OAPI) an und nach dem Namen jedes solchen Staats (oder OAPI) das Aktenzeichen des Hauptschutzrechts oder der Hauptschutzrechtsanmeldung und das Datum der Erteilung des Hauptschutzrechts oder der Einreichung der Hauptschutzrechtsanmeldung.
- (vi) Wenn in Feld Nr. VI die Priorität von mehr als drei früheren Anmeldungen beansprucht wird: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. VI" und machen für jede weitere frühere Anmeldung die entsprechenden, in Feld Nr. VI vorgeschriebenen Angaben.
- (vii) Wenn in Feld Nr. VI die frühere Anmeldung eine ARIPO Anmeldung ist: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. VI" und geben, unter Angabe der Nummer der Zeile, in der die die frühere Anmeldung betreffenden Angaben gemacht sind, mindestens einen Staat an, der Mitglied der Pariser Verbandsübereinkunft zum Schutz des gewerblichen Eigentums ist und für den die frühere Anmeldung erfolgte.

2. Wenn, im Hinblick auf die Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen in Feld Nr. V, der Anmelder Staaten von dieser Erklärung ausnehmen möchte: In diesem Fall schreiben Sie "Bestimmung(en), die von der Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen ausgenommen ist(sind)" und geben den Namen oder den Zweibuchstaben-Code jedes so ausgeschlossenen Staates an.

3. Wenn der Anmelder für irgendein Bestimmungsamt die Vorteile nationaler Vorschriften betreffend unschädliche Offenbarung oder Ausnahmen von der Neuheitsschädlichkeit in Anspruch nimmt: In diesem Fall schreiben Sie "Erklärung betreffend unschädliche Offenbarung oder Ausnahmen von der Neuheitsschädlichkeit" und geben im folgenden die entsprechende Erklärung ab.

2/10

Fortsetzung von Feld Nr. IX

Karin Bohnet

1) Karin Bohnet

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Zusatzfeld Wird dieses Zusatzfeld nicht benutzt, so sollte dieses Blatt dem Antrag nicht beigelegt werden.

1. Wenn der Platz in einem Feld nicht für alle Angaben ausreicht: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. ..." (Nummer des Feldes angeben) und machen die Angaben entsprechend der in dem Feld, in dem der Platz nicht ausreicht, vorgeschriebenen Art und Weise, insbesondere:

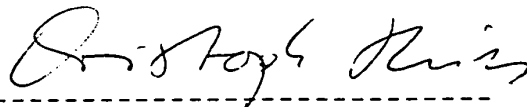
- (i) Wenn mehr als zwei Anmelder und/oder Erfinder vorhanden sind und kein "Fortsetzungsblatt" zur Verfügung steht: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. III" und machen für jede weitere Person die in Feld Nr. III vorgeschriebenen Angaben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.
- (ii) Wenn in Feld Nr. II oder III die Angabe "die im Zusatzfeld angegebenen Staaten" angekreuzt ist: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. II", "Fortsetzung von Feld Nr. III" bzw. "Fortsetzung von Feld Nr. II und Nr. III" und geben den Namen des Anmelders oder die Namen der Anmelder an und neben jedem Namen den Staat oder die Staaten (und/oder ggf. ARIPO-, eurasisches, europäisches oder OAPI-Patent), für die die bezeichnete Person Anmelder ist.
- (iii) Wenn der in Feld Nr. II oder III genannte Erfinder oder Erfinder/Anmelder nicht für alle Bestimmungsstaaten oder für die Vereinigten Staaten von Amerika als Erfinder benannt ist: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. II", "Fortsetzung von Feld Nr. III" bzw. "Fortsetzung von Feld Nr. II und Nr. III" und geben den Namen des Erfinders oder die Namen der Erfinder an und neben jedem Namen den Staat oder die Staaten (und/oder ggf. ARIPO-, eurasisches, europäisches oder OAPI-Patent), für die die bezeichnete Person Erfinder ist.
- (iv) Wenn zusätzlich zu dem Anwalt oder den Anwälten, die in Feld Nr. IV angegeben sind, weitere Anwälte bestellt sind: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. IV" und machen für jeden weiteren Anwalt die entsprechenden, in Feld Nr. IV vorgeschriebenen Angaben.
- (v) Wenn in Feld Nr. V bei einem Staat (oder bei OAPI) die Angabe "Zusatzpatent" oder "Zusatzzertifikat," oder wenn in Feld Nr. V bei den Vereinigten Staaten von Amerika die Angabe "Fortsetzung" oder "Teilfortsetzung" hinzugefügt wird: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. V" und geben den Namen des betreffenden Staats (oder OAPI) an und nach dem Namen jedes solchen Staats (oder OAPI) das Aktenzeichen des Hauptschutzrechts oder der Hauptschutzrechtsanmeldung und das Datum der Erteilung des Hauptschutzrechts oder der Einreichung der Hauptschutzrechtsanmeldung.
- (vi) Wenn in Feld Nr. VI die Priorität von mehr als drei früheren Anmeldungen beansprucht wird: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. VI" und machen für jede weitere frühere Anmeldung die entsprechenden, in Feld Nr. VI vorgeschriebenen Angaben.
- (vii) Wenn in Feld Nr. VI die frühere Anmeldung eine ARIPO Anmeldung ist: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. VI" und geben, unter Angabe der Nummer der Zeile, in der die frühere Anmeldung betreffenden Angaben gemacht sind, mindestens einen Staat an, der Mitglied der Pariser Verbandsübereinkunft zum Schutz des gewerblichen Eigentums ist und für den die frühere Anmeldung erfolgte.

2. Wenn, im Hinblick auf die Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen in Feld Nr. V, der Anmelder Staaten von dieser Erklärung ausnehmen möchte: In diesem Fall schreiben Sie "Bestimmung(en), die von der Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen ausgenommen ist(sind)" und geben den Namen oder den Zweibuchstaben-Code jedes so ausgeschlossenen Staates an.

3. Wenn der Anmelder für irgendeine Bestimmungsamt die Vorteile nationaler Vorschriften betreffend unschädliche Offenbarung oder Ausnahmen von der Neuheitsschädlichkeit in Anspruch nimmt: In diesem Fall schreiben Sie "Erklärung betreffend unschädliche Offenbarung oder Ausnahmen von der Neuheitsschädlichkeit" und geben im folgenden die entsprechende Erklärung ab.

20/10

Fortsetzung von Feld Nr. IX



2) Christoph Hüls

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Zusatzfeld Wird dieses Zusatzfeld nicht benutzt, so sollte dieses Blatt dem Antrag nicht beigelegt werden.

1. Wenn der Platz in einem Feld nicht für alle Angaben ausreicht: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. ..." [Nummer des Feldes angeben] und machen die Angaben entsprechend der in dem Feld, in dem der Platz nicht ausreicht, vorgeschriebenen Art und Weise, insbesondere:

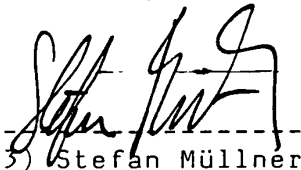
- (i) Wenn mehr als zwei Anmelder und/oder Erfinder vorhanden sind und kein "Fortsetzungsblatt" zur Verfügung steht: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. III" und machen für jede weitere Person die in Feld Nr. III vorgeschriebenen Angaben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.
- (ii) Wenn in Feld Nr. II oder III die Angabe "die im Zusatzfeld angegebenen Staaten" angekreuzt ist: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. II", "Fortsetzung von Feld Nr. III" bzw. "Fortsetzung von Feld Nr. II und Nr. III" und geben den Namen des Anmelders oder die Namen der Anmelder an und neben jedem Namen den Staat oder die Staaten (und/oder ggf. ARIPO-, eurasisches, europäisches oder OAPI-Patent), für die die bezeichnete Person Anmelder ist.
- (iii) Wenn der in Feld Nr. II oder III genannte Erfinder oder Erfinder/Anmelder nicht für alle Bestimmungsstaaten oder für die Vereinigten Staaten von Amerika als Erfinder benannt ist: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. II", "Fortsetzung von Feld Nr. III" bzw. "Fortsetzung von Feld Nr. II und Nr. III" und geben den Namen des Erfinders oder die Namen der Erfinder an und neben jedem Namen den Staat oder die Staaten (und/oder ggf. ARIPO-, eurasisches, europäisches oder OAPI-Patent), für die die bezeichnete Person Erfinder ist.
- (iv) Wenn zusätzlich zu dem Anwalt oder den Anwälten, die in Feld Nr. IV angegeben sind, weitere Anwälte bestellt sind: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. IV" und machen für jeden weiteren Anwalt die entsprechenden, in Feld Nr. IV vorgeschriebenen Angaben.
- (v) Wenn in Feld Nr. V bei einem Staat (oder bei OAPI) die Angabe "Zusatzpatent" oder "Zusatzzertifikat," oder wenn in Feld Nr. V bei den Vereinigten Staaten von Amerika die Angabe "Fortsetzung" oder "Teilfortsetzung" hinzugefügt wird: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. V" und geben den Namen des betreffenden Staats (oder OAPI) an und nach dem Namen jedes solchen Staats (oder OAPI) das Aktenzeichen des Hauptschutzrechts oder der Hauptschutzrechtsanmeldung und das Datum der Erteilung des Hauptschutzrechts oder der Einreichung der Hauptschutzrechtsanmeldung.
- (vi) Wenn in Feld Nr. VI die Priorität von mehr als drei früheren Anmeldungen beansprucht wird: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. VI" und machen für jede weitere frühere Anmeldung die entsprechenden, in Feld Nr. VI vorgeschriebenen Angaben.
- (vii) Wenn in Feld Nr. VI die frühere Anmeldung eine ARIPO Anmeldung ist: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. VI" und geben, unter Angabe der Nummer der Zeile, in der die die frühere Anmeldung betreffenden Angaben gemacht sind, mindestens einen Staat an, der Mitglied der Pariser Verbandsübereinkunft zum Schutz des gewerblichen Eigentums ist und für den die frühere Anmeldung erfolgte.

2. Wenn, im Hinblick auf die Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen in Feld Nr. V, der Anmelder Staaten von dieser Erklärung ausnehmen möchte: In diesem Fall schreiben Sie "Bestimmung(en), die von der Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen ausgenommen ist(sind)" und geben den Namen oder den Zweibuchstaben-Code jedes so ausgeschlossenen Staates an.

3. Wenn der Anmelder für irgendein Bestimmungsamt die Vorteile nationaler Vorschriften betreffend unschädliche Offenbarung oder Ausnahmen von der Neuheitsschädlichkeit in Anspruch nimmt: In diesem Fall schreiben Sie "Erklärung betreffend unschädliche Offenbarung oder Ausnahmen von der Neuheitsschädlichkeit" und geben im folgenden die entsprechende Erklärung ab.

2/16

Fortsetzung von Feld Nr. IX


Stefan Müller

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

REC'D 12 OCT 2000

WIPO

PCT

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 1998/FO83 NP	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/04892	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 10/07/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 22/07/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/61		
Anmelder AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES GMBH&CO.KG et al.		



- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 10 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor di s r Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

 Diese Anlagen umfassen insgesamt 5 Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☒ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 11/01/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 06.10.00
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Wimmer, G Tel. Nr. +49 89 2399 7347 

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/04892

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-27 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

2 eingegangen am 09/06/2000 mit Schreiben vom 07/06/2000

1,3-24 eingegangen am 19/08/2000 mit Schreiben vom 17/08/2000

Zeichnungen, Blätter:

1/5-5/5 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

IV. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

1. Auf die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der Anmelder:

- ☐ die Ansprüche eingeschränkt.
- ☐ zusätzliche Gebühren entrichtet.
- ☐ zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/04892

- ☐ weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.
2. ☒ Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern.
3. Die Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2 und 13.3
- ☐ erfüllt ist
- ☒ aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist:
siehe Beiblatt
4. Daher wurde zur Erstellung dieses Berichts eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der internationalen Anmeldung durchgeführt:
- ☒ alle Teile.
- ☐ die Teile, die sich auf die Ansprüche Nr. beziehen.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	7-24
	Nein: Ansprüche	1-6
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	9-13
	Nein: Ansprüche	7-8, 14-24
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-20, 23-24
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Die vorliegende Patentanmeldung beschreibt zwei neue Proteine, Hc1 und Hc2, welche der Gruppe der DEAD-box Proteine angehören, Nukleinsäuren welche für diese Proteine kodieren, sowie mögliche Anwendungen dieser Proteine und Nukleinsäuren.

In Folge bezieht sich die Bezeichnung "Hc1" auf das Protein mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID 14, bzw. einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID 13. Analog bezieht sich die Bezeichnung "Hc2" auf ein Protein gemäß der Amino- bzw. Nukleinsäuresequenzen SEQ ID 16 bzw. SEQ. ID 15.

Zu Punkt I

Basis des Prüfungsberichtes.

Die am 19. 8. 2000 (mit Brief vom 17. 8. 2000) eingereichten geänderten Ansprüche wurden als Basis dieses Prüfungsberichtes herangezogen.

Jedoch wurde **Anspruch 2** nicht als gültig anerkannt, da darin "Nukleinsäuren... und Teile davon mit mindestens 25 Nukleotiden..." beansprucht sind (Das Begleitschreiben spricht in der Beschreibung der geänderten Ansprüche allerdings von "22 Nukleotiden").

Dies entbehrt jedoch der Grundlage in der Beschreibung, da in der im Begleitschreiben zitierten Textpassage der Beschreibung (S. 6, Z. 15) "eine Nukleinsäure aus mindestens ca. 20 Nukleotiden" beschrieben wird.

Der mit 19. 8. 2000 eingereichte Anspruch 2 ist somit gemäß Art. 41(2) PCT nicht gültig.

Als Basis dieses Prüfungsberichtes wird somit für Anspruch 2 die mit 9. 6. 2000 eingereichte Version dieses Anspruches herangezogen.

Zu Punkt IV

Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung.

Obwohl Hc1 und Hc2 der Gruppe der DEAD-box Proteine angehören, zeigen Sequenzvergleiche mit anderen Proteinen dieser Gruppe eine Verwandtschaft von Hc1 zur Untergruppe der p68 und p72 Proteine (D1, D2); Hc2 dagegen scheint mit den eIF-4A Proteinen verschiedener Spezies näher verwandt (D3, D4).

Obwohl, wie unter Punkt V.6 angeführt, für beide in der vorliegenden Anmeldung

THIS PAGE BLANK (USPTO)

beanspruchten Gene für sich die Isolation aus Tetrahymena zur Anerkennung eines erfinderischen Schrittes beiträgt, so ist diese Tatsache jedoch keine ausreichende Basis für eine Kombination der Gene und Proteine Hc1 und Hc2, zu einer einheitlichen Erfindung, da in der Isolation von verschiedenen Genen aus Tetrahymena kein Besonderes Technisches Merkmal entsprechend Art. 13.2 PCT gesehen werden kann.

Auch die Kombination "RNA-Helikase aus Tetrahymena" kann nicht als besonderes technisches Merkmal gelten, da beide Gene sehr unterschiedlichen Untergruppen von RNA-Helikasen angehören. Darüber hinaus wurde bereits eine Vielzahl verschiedener RNA-Helikasen aus anderen Organismen isoliert, und durch das Merkmal ihrer Bereitstellung aus Tetrahymena wird offenbar ebenfalls kein neuer technischer Effekt erzielt.

Ein gemeinsames besonderes technisches Merkmal nach Art. 13.2 PCT ist somit nicht vorhanden, und eine Einheitlichkeit der Erfindung nicht gegeben.

Die vorliegende Anmeldung umfaßt infolgedessen 2 Erfindungen:

- 1) Gen und Protein gemäß SEQ ID 13 und 14;
- 2) Gen und Protein gemäß SEQ ID 15 und 16.

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung.

Der Antrag entspricht nicht den Bestimmungen gemäß Art. 33 PCT, da **Ansprüche 1-6 nicht neu** sind und **Ansprüche 7-8 und 14-24 keinen erfinderischen Schritt** beinhalten.

- 1) Im Anschluß wird auf folgende Dokumente Bezug genommen (die Reihenfolge der Dokumente entspricht der Reihenfolge ihrer Auflistung im Internationalen Recherchenbericht):

D1: 'Schizosaccharomyces pombe p68 protein; p68 gene; RNA helicase' EMBL

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- SEQUENCE DATABASE, 19. April 1991 (1991-04-19), XP002121699 Cambridge, UK & R.D. IGGO ET AL.: 'p68 RNA helicase: Identification of a nucleolar form and cloning of related genes containing a conserved intron in yeasts' MOL. CELL. BIOL., Bd. 11, Nr. 3, März 1991 (1991-03), Seiten 1326- 1333, ASM WASHINGTON, DC,US
- D2: 'Human DEAD-box protein p72' EMBL SEQUENCE DATABASE, 5. Oktober 1996 (1996-10-05), XP002121700 Cambridge, UK & G.M. LAMM ET AL.: 'p72: a human nuclear DEAD box protein highly related to p68' NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 24, Nr. 19, 1996, Seiten 3739-3747, IRL PRESS LIMITED,OXFORD,ENGLAND
- D3: 'A. thaliana mRNA for eucaryotic translation initaiation factor 4A-2' EMBL SEQUENCE DATABASE, 20. November 1992 (1992-11-20), XP002121701 Cambridge, UK & A.M. METZ ET AL.: 'Sequences for two cDNAs encoding Arabisopsis thaliana eucaryotic protein synthesis initiation factor 4A' GENE, Bd. 120, 1992, Seiten 313-314, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS,B.V.,AMSTERDAM,NL;
- D4: 'N. plumbaginifolia Nelf-4A2 mRNA for nicotiana eucaryotic translation initiation factor 4A' EMBL SEQUENCE DATABASE, 24. Oktober 1991 (1991- 10-24), XP002121702 Cambridge, UK & G.W. OWTTRIM ET AL.: 'Divergent genes for translation initiation factor eIF-4A are coordinately expressed in tobacco' NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 19, Nr. 20, 1991, Seiten 5491- 5496, IRL PRESS LIMITED,OXFORD,ENGLAND
- D8: "Saccharomyces cerevisiae TIF2 gene". EMBL SEQUENCE DATABASE, 17. Nov. 1988 (update 12. Nov. 1993), Accession No. X12814.

Neuheit gemäß Art. 33(2) PCT.

- 2) **Anspruch 1** bezieht sich auf "Nukleinsäuren kodierend für eine RNA-Helikase mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No. 14 und Teile davon mit mindestens 20 Nukleotiden [...]".
- Während Teile von SEQ ID 13, von mindestens 20 Nukleotiden Länge, im Stand der Technik noch nicht gezeigt wurden, muß bemerkt werden, daß aus einem Nukleinsäurefragment die Herkunft technisch nicht nachgewiesen werden kann (Definition eines Produktes durch den Prozeß zu dessen Herstellung).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Somit ist eine Nukleinsäure gemäß der obigen Formulierung identisch mit "Teilen einer Nukleinsäure mit mindestens 20 Nukleotiden, kodierend für ein *Fragment* einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No. 14".

Wie auch unter Punkt V.5 erläutert, sind Teile von SEQ ID No. 14 von 21 Aminosäuren Länge identisch mit bereits publizierten Sequenzen (D1). Damit sind Nukleinsäuren mit 63 Nukleotiden Länge, kodierend für ein Fragment einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No. 14, bereits publiziert.

Anspruch 1 ist daher nicht als neu anzusehen.

- 3) Wie unter Punkt VIII erläutert, erstreckt sich der Schutzbereich von Anspruch 2 auch auf Teile von Nukleinsäuren, welche für Fusionsproteine kodieren, und somit auch auf der vorliegenden Erfindung völlig unverwandte Nukleinsäuren. Somit erstreckt sich Anspruch 2 auch auf Teile *beliebiger* Nukleinsäuren mit mindestens 20 Nukleotiden, was nicht als neu anerkannt werden kann.
- 4) Desweiteren erstreckt sich der Schutzbereich von Anspruch 2 auf die Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID 13, und Teile davon mit mindestens 20 Nukleotiden. Obwohl die Nukleotidsequenzen, welche in D3 und D4 beschrieben werden, eine Sequenzidentität von 60 bzw. 63.4% zu SEQ ID 15 zeigen, sowie zusammenhängende identische Nukleotidfolgen von 14 bzw. 18 bp., zeigt Dokument D8, welches das TIF2 Gen aus *Saccharomyces cerevisiae* beschreibt, eine zusammenhängende identische Nukleotidfolge von 21 bp. Dies fällt ebenfalls in den Schutzbereich von Anspruch 2. Aus diesen Gründen kann Anspruch 2 nicht als neu angesehen werden.
- 5) Durch die Veröffentlichung von Nukleinsäuresequenzen gemäß den Ansprüchen 1 und 2 sind auch die technischen Merkmale der Ansprüche 3 und 6 bereits implizit dargelegt. Ansprüche 3 und 6 sind somit nicht neu.
- 6) Wie auch unter Punkt V.2 beschrieben, kann anhand einer isolierten Nukleinsäuresequenz nicht auf deren Abstammung rückgeschlossen werden. Das technische Merkmal der Abstammung einer bereits bekannten Nukleinsäure aus einem alternativen Organismus stellt daher kein Unterscheidungsmerkmal dar. Ansprüche 4 und 5 sind daher nicht neu.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- 7) Obwohl Ansprüche 7 und 8 Standardmethoden darstellen, sind sie als solche nicht im Stand der Technik beschrieben, und können als neu angesehen werden.
- 8) Dokumente D1 und D2 beschreiben Proteine einer Aminosäuresequenz mit jeweils 59.2 bzw. 56.8 % Sequenzidentität zu SEQ ID 14, und zusammenhängenden identischen Sequenzen von 21 bzw. 17 Aminosäuren. Anspruch 9 kann somit als neu angesehen werden kann.
- 9) Gleiches gilt für Anspruch 10, da die Proteine der Dokumente D3 und D4 jeweils 59.2 und 61.2 % Sequenzidentität zu SEQ ID 16, und zusammenhängende identische Sequenzen von jeweils 10 Aminosäuren aufweisen.
- 10) Gemäß seines Bezuges auf die neuen Ansprüche 9 und 10, kann auch ein Verfahren gemäß Anspruch 11 als neu gelten.
- 11) Ebenso können Antikörper bzw. deren Herstellung gemäß Ansprüchen 12 und 13 als neu angesehen werden. Obwohl wahrscheinlich ist, daß Antikörper gegen zahlreiche bereits bekannte p68, p72 und eIF-4A Proteine auch mit den vorliegenden Proteinen reagieren, kann dies jedoch zur Zeit nicht eindeutig gezeigt werden.
- 12) Die Gegenstände oder Verfahren gemäß den Ansprüchen 14-24 basieren auch auf Nukleinsäuren der Ansprüche 1-6, welche nicht das Kriterium der Neuheit erfüllen.
Allerdings zeigt der Stand der Technik solche Gegenstände und Verfahren nicht explizit auf. Ansprüche 14-24 sind daher als neu anzusehen.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Erfinderische Tätigkeit gemäß Art. 33(3) PCT.

- 13) Die Herstellung eines Expressionsvektors gemäß Anspruch 7, sowie ein Verfahren zur Herstellung einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 8, stellen Standardverfahren dar. Angesichts der Verwendung bzw. der Herstellung von Sequenzen, welche nicht das Kriterium der Neuheit erfüllen, kann ein erfinderischer Schritt nicht anerkannt werden.
- 14) Die Methode der Klonierung der beanspruchten Gene Hc1 und Hc2 stellt eine Standardmethode ohne erfinderischen Schritt dar, da die zur Isolation verwendeten PCR primer nur degenerierte Sequenzen der bereits beschriebenen p68/p72 bzw. eIF-4A Gene darstellen. Das Technische Problem besteht damit nur in der Bereitstellung eines Alternativen Organismus zur Isolation entsprechender Gene.
Tetrahymena stellt einen in diesem Gebiet häufig verwendeten Modellorganismus dar, womit die Klonierung von entsprechenden Proteinen aus Tetrahymena für den Fachmann zwar naheliegend ist; jedoch wird in keinem der Dokumente zum Stand der Technik ausdrücklich auf den genus Tetrahymena oder die Gruppe der Ciliata hingewiesen. Die Proteine der Ansprüche 9 und 10, sowie ein Verfahren zu deren Herstellung gemäß Anspruch 11, könnten somit als erfinderisch angesehen werden.
- 15) Entsprechend kann auch für die Bereitstellung von Antikörpern bzw. einem Verfahren zu deren Herstellung gemäß Ansprüchen 12 und 13 ein erfinderischer Schritt anerkannt werden.
- 16) Während die Gegenstände und Verfahren der Ansprüche 14-24 als neu angesehen werden, kann kein erfinderischer Schritt anerkannt werden.
Besagte Ansprüche beziehen sich auch auf mögliche Verwendungen von Nukleinsäuren der Ansprüche 1-6, welche nicht das Kriterium der Neuheit erfüllen. Allerdings sind diese Verwendungen für ähnliche Gene, Proteine, oder Fragmente dieser Gene oder Proteine bereits bekannt(wie auch in der Anmeldung selbst beschrieben, z.B. S. 2/22 - 4/6) bzw. stellen standardmäßige Verwendungen dar.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Nachdem die Anmelder darüber hinaus keinen technischen Effekt zeigen, welcher durch die Verwendung der Nukleinsäuren bzw. Peptide gemäß den vorliegenden Ansprüchen im Gegensatz zu bereits bekannten Verwendungen von ähnlichen Genen oder Proteinen erzielt wird, liegt ein erfinderischer Schritt für Ansprüche 14-24 nicht vor.

Gewerbliche Anwendbarkeit.

- 17) Die Gegenstände der Ansprüche 21 und 22 umfassen auch die Anwendung in der medizinischen Behandlung. Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände dieser Ansprüche gewerblich anwendbar sind, gibt es in den PCT-Vertragsstaaten keine einheitlichen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an; es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind (Siehe Regel 67(iv) PCT).

Zu Punkt VIII

Dem Wortlaut von Anspruch 2 zufolge erstreckt sich der Schutzbereich auch auf Teile mit mindestens 20 Nukleotiden einer Nukleinsäure, "kodierend für eine RNA-Helikase [...] *oder funktionelle Varianten davon*". Dies wäre jedoch nicht prüfbar, da gemäß der Definition von "funktionellen Varianten" (S. 12/19-13/11), eine solche Variante z.B. auch ein Fusionsprotein *enthaltend* SEQ ID 16 oder ein Protein mit Sequenzidentität von ca. 70% zu SEQ ID 16 sein könnte. Ein Teil der Nukleinsäure, die für ein solches Fusionsprotein codiert, kann demnach auch aus diesem Bereich sein, welcher für den Fusionspartner codiert, also völlig verschieden von z.B. SEQ ID 15. Dies kann nicht als neu angesehen werden.

Ähnlich verhält es sich mit Teilen einer Nukleinsäure, die z.B. für ein Protein mit 70% Sequenzidentität zu SEQ ID 14 codieren; ein solcher Anspruch wäre wegen der Fülle der Möglichkeiten nicht prüfbar.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Patentansprüche

1. Nukleinsäuren kodierend für eine RNA-Helikase mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No. 14 oder funktionelle Varianten davon, und Teile davon mit mindestens 20 Nukleotiden, wobei SEQ ID No. 13 Teil des Anspruchs ist und funktionelle Varianten Proteine mit einer Sequenzhomologie von mindestens 70 % oder Proteine mit Deletionen von bis zu 60 Aminosäuren oder Fusionsproteine, die die Aminosäuresequenz der SEQ ID No. 14 enthalten, sind.
2. Nukleinsäuren kodierend für eine RNA-Helikase mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No. 16 oder funktionelle Varianten davon, und Teile davon mit mindestens 20 Nukleotiden, wobei SEQ ID No. 15 Teil des Anspruchs ist und funktionelle Varianten Proteine mit einer Sequenzhomologie von mindestens 70 % oder Proteine mit Deletionen von bis zu 60 Aminosäuren oder Fusionsproteine, die die Aminosäuresequenz der SEQ ID No. 16 enthalten, sind.
3. Nukleinsäuren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuren eine DNA oder RNA, vorzugsweise eine doppelsträngige DNA sind.
4. Nukleinsäuren nach Anspruch 1 bis 3 erhältlich aus Ciliaten.
5. Nukleinsäuren nach Anspruch 4 erhältlich aus *Tetrahymena thermophila*.
6. DNA und RNA-Antisensestrang erhältlich aus Nukleinsäuren gemäß Anspruch 1 bis 5.
7. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure in einem Vektor, vorzugsweise in einem Expressionsvektor oder gentherapeutisch wirksamen Vektor, enthalten ist.
8. Verfahren zur Herstellung einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure chemisch synthetisiert oder anhand einer Sonde aus einer Genbank isoliert wird.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Patentansprüche

1. Nukleinsäuren kodierend für eine RNA-Helikase mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No. 14 und Teile davon mit mindestens 20 Nukleotiden, wobei SEQ ID No. 13 Teil des Anspruchs ist, und Nukleinsäuren kodierend für funktionelle Varianten der RNA-Helikase gemäß SEQ ID No. 14, wobei funktionelle Varianten Proteine mit einer Sequenzhomologie von mindestens 70 % oder Proteine mit Deletionen von bis zu 60 Aminosäuren oder Fusionsproteine, die die Aminosäuresequenz der SEQ ID No. 14 enthalten, sind.
2. Nukleinsäuren kodierend für eine RNA-Helikase mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No. 16 und Teile davon mit mindestens 25 Nukleotiden, wobei SEQ ID No. 15 Teil des Anspruchs ist, und Nukleinsäuren kodierend für funktionelle Varianten der RNA-Helikase gemäß SEQ ID No. 16, wobei funktionelle Varianten Proteine mit einer Sequenzhomologie von mindestens 70 % oder Proteine mit Deletionen von bis zu 60 Aminosäuren oder Fusionsproteine, die die Aminosäuresequenz der SEQ ID No. 16 enthalten, sind.
3. Nukleinsäuren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuren eine DNA oder RNA, vorzugsweise eine doppelsträngige DNA sind.
4. Nukleinsäuren nach Anspruch 1 bis 3 erhältlich aus Ciliaten.
5. Nukleinsäuren nach Anspruch 4 erhältlich aus *Tetrahymena thermophila*.
6. DNA und RNA-Antisensestrang erhältlich aus Nukleinsäuren gemäß Anspruch 1 bis 5.
7. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure in einem Vektor, vorzugsweise in einem Expressionsvektor oder gentherapeutisch wirksamen Vektor, enthalten ist.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

8. Verfahren zur Herstellung einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure chemisch synthetisiert oder anhand einer Sonde aus einer Genbank isoliert wird.
9. Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No. 14 und Teile davon mit mindestens 65 Aminosäuren und funktionelle Varianten des Polypeptids gemäß SEQ ID No. 14, wobei eine funktionelle Variante ein Polypeptid mit einer Sequenzhomologie von mindestens 70 % oder ein Polypeptid mit Deletionen von bis zu 60 Aminosäuren oder ein Fusionsprotein, das die Aminosäuresequenz der SEQ ID No. 14 umfaßt, ist.
10. Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No. 16 und Teile davon mit mindestens 12 Aminosäuren und funktionelle Varianten des Polypeptids gemäß SEQ ID No. 16, wobei eine funktionelle Variante ein Protein mit einer Sequenzhomologie von mindestens 70 % oder ein Protein mit Deletionen von bis zu 60 Aminosäuren oder ein Fusionsprotein, das die Aminosäuresequenz der SEQ ID No. 16 umfaßt, ist.
11. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids gemäß Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 in einer geeigneten Wirtszelle exprimiert wird.
12. Antikörper gegen ein Polypeptid gemäß Anspruch 9 oder 10.
13. Verfahren zur Herstellung eines Antikörpers gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß ein Säugetier mit einem Polypeptid gemäß Anspruch 9 oder 10 immunisiert und gegebenenfalls die entstandenen Antikörper isoliert werden.
14. Arzneimittel enthaltend eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 9 oder 10 und gegebenenfalls pharmazeutisch annehmbare Zusatz- und / oder Hilfsstoffe.
15. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Krebs, Autoimmunkrankheiten, insbesondere Multiple Sklerose oder Rheumatoide

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Arthritis, Alzheimer-Krankheit, Allergien, insbesondere Neurodermitis, Typ I Allergien oder Typ IV Allergien, Arthrose, Atherosklerose, Osteoporose, akute und chronische Infektionskrankheiten und/oder Diabetis und / oder zur Beeinflussung des Zellmetabolismus, insbesondere bei der Immunsuppression, vor allem bei Transplantationen und/oder Erbkrankheiten, insbesondere Werner Syndrom, Bloom Syndrom, Xeroderma pigmentosa, Bindegewebskrankheiten, dadurch gekennzeichnet, daß eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1-6 oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 9 oder 10 oder Antikörper gemäß Anspruch 12 mit einem pharmazeutisch annehmbaren Zusatz- und / oder Hilfsstoff formuliert wird.

16. Diagnostikum enthaltend eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1-6 oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 9 oder 10 oder Antikörper gemäß Anspruch 12 und gegebenenfalls geeignete Zusatz- und / oder Hilfsstoffe.
17. Verfahren zur Herstellung eines Diagnostikums zur Diagnose von Krebs, Autoimmunkrankheiten, insbesondere Multiple Sklerose oder Rheumatoide Arthritis, Alzheimer-Krankheit, Allergien, insbesondere Neurodermitis, Typ I Allergien oder Typ IV Allergien, Arthrose, Atherosklerose, Osteoporose, akute und chronische Infektionskrankheiten und / oder Diabetis und/oder zur Analyse des Zellmetabolismus, insbesondere des Immunstatus, vor allem bei Transplantationen und / oder zur Analyse von Erbkrankheiten, insbesondere Werner Syndrom, Bloom Syndrom, Xeroderma pigmentosa, Bindegewebskrankheiten, dadurch gekennzeichnet, daß eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 - 6 oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 9 oder 10 oder Antikörper gemäß Anspruch 12 mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger versetzt wird.
18. Test zur Identifizierung von funktionellen Interaktoren enthaltend eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 - 6 oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 9 oder 10 oder Antikörper gemäß Anspruch 12 und gegebenenfalls geeignete Zusatz- und / oder Hilfsstoffe.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

19. Verwendung einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 - 6 oder eines Polypeptids gemäß Anspruch 9 oder 10 zur Identifizierung funktioneller Interaktoren.
20. Verwendung einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 - 6 zum Auffinden von Varianten der RNA-Helikase, dadurch gekennzeichnet, daß eine Genbank mit der genannten Nukleinsäure abgesucht und die gefundene Variante isoliert wird.
21. Verwendung der Nukleinsäuren gemäß einem der Ansprüche 1 - 6 oder eines Polypeptids gemäß Anspruch 9 oder 10 zur Beeinflussung der Proteinbiosynthese.
22. Verwendung der Nukleinsäuren und Polypeptide gemäß Anspruch 21 zur Hemmung der Degradation der mRNA und / oder Stimulation der Degradation der mRNA und / oder Stabilisierung von mRNA.
23. Verwendung der Nukleinsäuren und Polypeptide nach Anspruch 21 zur heterologen Expression in Nutzpflanzen.
24. Verwendung der Nukleinsäuren gemäß einem der Ansprüche 1 - 6 oder eines Polypeptids gemäß Anspruch 9 oder 10 als Selektionsmarker in der Molekularbiologie.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)